

**Università degli Studi
del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**

**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
(XIX ciclo)**

Relazione 4° anno

**“ALTI LIVELLI DI XIAP ASSOCIATI AD UN
POLIMORFISMO NEL SUO GENE SONO FATTORE
DI RISCHIO PER LO SVILUPPO DI SINDROME DA
FEBBRE PERIODICA”**

Massimo Ferretti

Responsabile del progetto:
Prof. Umberto Dianzani

INTRODUZIONE I

La risposta immunitaria[1].

La risposta immunitaria specifica coinvolge linfociti B e T attivati dal riconoscimento di antigeni estranei non-self. I linfociti B riconoscono la maggior parte delle molecole solubili nella loro forma nativa, mentre i linfociti T riconoscono frammenti peptidici processati e presentati dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) espresso sulla superficie di cellule presentanti l'antigene (APC), quali macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B. Il riconoscimento dello specifico epitopo antigenico verso cui è reattivo un linfocita, tuttavia, non è sufficiente ad attivare il linfocita verso di esso, ma è necessario un secondo segnale derivato da molecole costimolatorie. La sola stimolazione dovuta al primo dei due segnali induce energia cellulare o apoptosi e la tolleranza periferica verso gli antigeni self. Il secondo segnale è trasmesso ai linfociti T dalle cellule APC tramite segnali infiammatori e ai linfociti B da linfociti T attivati che riconoscono l'antigene presentato dalle cellule B stesse. Questo sistema fa sì che la risposta immunitaria specifica sia attivata esclusivamente in un contesto infiammatorio, il che riduce la possibilità dello sviluppo di aggressioni contro il self.

L'attivazione linfocitaria è accompagnata da modifiche di espressione di molti geni che codificano per molecole di superficie coinvolte nella proliferazione e nelle funzioni effettrici dei linfociti, che garantiscono l'espansione clonale dei linfociti antigene-specifici e la loro differenziazione in cellule effettrici (plasmacellule, linfociti T citotossici, ecc.). Ruolo importante dell'attivazione è anche lo stimolo all'espressione di molte molecole coinvolte in seguito nello spegnimento della risposta immunitaria. Tale evento si verifica tramite l'induzione di apoptosi di gran parte delle cellule effettrici, ma mantenendo un piccolo pool di cellule memoria, a garantire una più veloce ed efficace risposta nel caso in cui venga nuovamente incontrato lo stesso antigene.

Il ruolo dello spegnimento della risposta immunitaria è cruciale per controllare l'espansione del corredo linfocitario periferico, che rimane pressoché invariato grazie all'eliminazione delle cellule effettrici e alla diminuzione del corredo di cellule linfocitarie *naive* compensata dalla moderata espansione delle cellule memoria. Questo sistema di controllo garantisce che non vi sia un accumulo di cloni linfocitari negli organi linfoidi secondari e che tale accumulo funzioni da fattore promuovente lo sviluppo di reazioni autoimmuni e di neoplasie linfocitarie.

E' inoltre noto come il processo di spegnimento della risposta immunitaria risulta cruciale per ridurre il rischio di autoimmunità derivate dalla cross-reattività tra alcuni antigeni non- self e self. Il modello del mimetismo molecolare assume infatti che la cross-reattività giochi un ruolo fondamentale nelle malattie autoimmuni ed è basato sul fatto che molte proteine di origine virali possiedono al loro interno sequenze peptidiche molto simili a quelle delle proteine self. Tale modello assume quindi che, una volta eliminato l'agente estraneo, il sistema immunitario possa continuare ad agire contro le molecole self cross-reattive e indurre malattie autoimmuni, evitando il controllo sopra descritto. La capacità di poter spegnere la risposta immunitaria è quindi importante per diminuire il rischio di sviluppare autoimmunità.

Nel sistema immunitario, l'apoptosi è il meccanismo principale con cui i linfociti in maturazione negli organi linfoidi primari vengono sottoposti alla selezione negativa per eliminare cellule potenzialmente autoreattive. L'induzione di apoptosi è anche il meccanismo preferenziale che viene attivato dalle cellule citotossiche contro le cellule bersaglio. La fisiologia dell'apoptosi prevede l'autodigestione controllata della cellula che innesca la propria morte programmata attivando una cascata di proteasi endogene. Questo porta al rimaneggiamento del citoscheletro, vescicolazione della membrana, condensazione e frammentazione degli acidi nucleici ed espressione di molecole bersaglio per i macrofagi tissutali. Prima di essere fagocitate inoltre le cellule apoptotiche si scindono in vescicole, chiamate corpi apoptotici, mantenendo l'integrità della membrana plasmatica evitando la dispersione del contenuto citoplasmatico.

Autoimmunità.

Eziologia e patogenesi delle malattie autoimmuni

Agli inizi del '900 Paul Ehrlich propose che il sistema immunitario poteva reagire in modo errato dirigendo il proprio attacco contro antigeni autologhi (*self*) invece che contro antigeni estranei e producesse danni tissutali.

Oggi sappiamo che i sistemi di tolleranza al *self*, che normalmente proteggono ciascun individuo dai linfociti potenzialmente autoreattivi, possono in certi casi fallire. Questi fallimenti portano allo sviluppo di una risposta inappropriata del sistema immunitario contro tessuti *self*, fenomeno detto **autoimmunità**.

Negli anni '60 si riteneva che tutti i linfociti autoreattivi fossero eliminati durante la maturazione linfocitaria e che le malattie autoimmuni fossero l'inevitabile conseguenza di errori nel processo di delezione delle cellule autoreattive negli organi linfatici primari.

A partire dalla fine degli anni '70 sono state ottenute numerose evidenze sperimentali in contrasto con questo modello. Infatti, linfociti autoreattivi maturi circolanti sono normalmente presenti nei soggetti sani normali.

Poiché la presenza di queste cellule non porta inevitabilmente allo sviluppo di manifestazioni autoimmuni, la loro attività deve essere regolata attraverso meccanismi tollerogenici attivi in periferia. L'alterazione di questi meccanismi può portare all'attivazione di cloni di linfociti autoreattivi e al conseguente sviluppo di reazioni umorali o cellulari contro antigeni *self*.

In molti casi i fattori scatenanti che determinano il passaggio da una potenziale autoreattività alla malattia autoimmune sono gli agenti infettivi, spesso di tipo virale.

Le infezioni possono scatenare la malattia attraverso vari meccanismi:

1) La presenza negli agenti infettivi di antigeni simili ad antigeni *self* (fenomeno del "mimetismo molecolare"), come già accennato prima, può determinare una "cross-reazione" contro il *self* da parte della risposta anti-agente infettivo dopo che quest'ultimo è stato eliminato.

2) L'infezione può danneggiare i tessuti causando la liberazione di antigeni normalmente sequestrati, che non sono mai venuti in contatto con il sistema immunitario e che sono quindi erroneamente riconosciuti come non *self*.

3) Infine il processo infiammatorio cronico locale innescato dall'infezione nel tessuto, determina produzione di citochine e l'attivazione delle APC aumentandone la capacità di presentare gli antigeni e le capacità costimolatorie; la presenza di questo ambiente iper-reattivo potrà permettere l'attivazione di linfociti T autoreattivi che non si sarebbero mai attivati in un contesto immunologicamente a riposo.

I meccanismi appena descritti non sono mutualmente esclusivi, ma intervengono insieme, e probabilmente ciò determina il fenomeno conosciuto come *epitope spreading*, molto frequente nelle malattie autoimmuni. Infatti nel corso della malattia, si passa da una fase iniziale, dove la risposta immune è diretta verso un singolo epitopo di una proteina *self*, ad una risposta autoimmune più vasta indirizzata sia verso epitopi diversi della stessa proteina sia verso proteine diverse (espansione epitopica).

Le malattie autoimmuni possono essere divise in due grandi categorie: quelle organo-specifiche e quelle sistemiche.

Nelle malattie autoimmuni organo-specifiche, la risposta immunitaria è diretta contro un antigene bersaglio espresso selettivamente da un certo organo, per cui le manifestazioni della malattia sono in gran parte limitate ad esso. Nelle malattie autoimmuni sistemiche la risposta è diretta contro antigeni bersaglio espressi ubiquitariamente in numerosi tessuti e coinvolge quindi più organi e tessuti.

Dal punto di vista del meccanismo immunopatogenetico, le malattie autoimmuni possono essere mediate da anticorpi oppure da cellule.

Le prime comprendono malattie come le emocitopenie autoimmuni, causate da autoanticorpi contro vari tipi di cellule del sangue, oppure il lupus eritematoso sistemico, causato dalla deposizione in vari tessuti di immunocomplessi formati principalmente da anticorpi contro complessi DNA-istoni o RNA-ribonucleoproteine e i rispettivi autoantigeni. Fanno parte di questa categoria anche alcune malattie autoimmuni organo-specifiche causate da autoanticorpi capaci di esercitare un'attività agonista o antagonista sull'organo bersaglio; ad esempio nel morbo di Graves-Basedow anticorpi anti-recettore del TSH causano iperfunzione tiroidea, mentre nella miastenia grave anticorpi contro il recettore dell'acetilcolina inibiscono la trasmissione dell'impulso neuromuscolare.

Le malattie autoimmuni cellulo-mediate sono una categoria in continua crescita e sono mediate principalmente da linfociti T helper di tipo 1 (Th1), caratterizzati dalla produzione delle citochine proinfiammatorie IL-2, IFN γ e Linfotossina, e da linfociti T citotossici (Tc). Esempi di questo tipo di malattie autoimmuni sono il diabete mellito di tipo 1 oppure la sclerosi multipla in cui i linfociti Th1 e Tc aggrediscono rispettivamente le cellule β del pancreas e la mielina del sistema nervoso centrale. In queste malattie si osserva spesso anche la produzione di autoanticorpi, che sono considerati utili marcatori dello sviluppo della malattia, ma questi sarebbero conseguenza del fenomeno dell'*epitope spreading* e avrebbero un modesto ruolo patogenetico.

Predisposizione genetica

Molte malattie autoimmuni presentano un certo grado di familiarità. Questo ha indotto lo svolgimento di una enorme mole di studi volti a definire i fattori genetici coinvolti nel loro sviluppo. Nel loro complesso i dati ottenuti disegnano il quadro tipico delle malattie multifattoriali in cui un insieme di geni diversi possono influire nella suscettibilità genetica allo sviluppo della malattia, che richiede comunque l'induzione da parte di fattori scatenanti.

Molti studi genetici hanno evidenziato l'associazione statistica di malattie autoimmuni con particolari polimorfismi di specifici geni, ovvero è stato dimostrato che una certa malattia autoimmune è più frequente nei portatori di un determinato allele di un certo gene. Tuttavia spesso non è chiaro se questi geni siano coinvolti direttamente nello sviluppo della malattia oppure se l'associazione statistica sia legata a fenomeni di *linkage disequilibrium*, ovvero al fatto che un allele si associa frequentemente ad un particolare allele di un altro gene non noto, posto per lo più in vicinanza al primo e coinvolto nella genesi della malattia.

Nel complesso, i fattori genetici che sono stati associati con maggiore certezza all'autoimmunità e la cui base biologica sia stata dimostrata in modo soddisfacente sono il sesso e l'aplotipo HLA. A questi si sono più recentemente affiancati fattori genetici in grado di controllare lo spegnimento della risposta immunitaria.

Associazione col sesso

Numerose malattie autoimmuni hanno un diversa frequenza nel sesso femminile e in quello maschile. Molte di esse, come il lupus eritematoso sistemico, la miastenia grave, la sclerosi multipla e la sindrome di Sjögren, sono molto più frequenti nelle femmine piuttosto che nei maschi. Viceversa la spondilite anchilosante è più frequente nei maschi.

I motivi di questa diversa suscettibilità non sono noti con certezza, ma è probabile che un ruolo centrale sia giocato dagli ormoni sessuali. Non è chiaro se gli ormoni sessuali steroidei abbiano un'azione diretta sui linfociti, tuttavia questa possibilità è suggerita dal fatto che altri steroidi, come il cortisone, hanno un effetto molto potente. Inoltre altri ormoni espressi diversamente nel maschio e nella femmina, come la prolattina, hanno effetto sui linfociti, come dimostrato dal fatto che il recettore per la prolattina è espresso dai linfociti sia T sia B e che la loro risposta a stimoli di attivazione è modulata in vitro da questo ormone.

E' noto che gli ormoni sessuali modulano notevolmente la risposta immunitaria durante la gravidanza indirizzando prevalentemente la risposta immune verso risposte di tipo Th2. Questo presenta due vantaggi: 1) favorisce le risposte anticorpali di tipo IgG, che sono protettive per il feto dal momento che le IgG superano la barriera placentare; 2) riduce le risposte cellulo-mediate che potrebbero invece aggredire la placenta, che è un organo non self. In effetti alcune forme di aborto precoce ricorrente sono state attribuite ad una eccessiva risposta Th1 o CTL contro la placenta.

In linea con queste osservazioni la gravidanza esacerba alcune malattie autoimmuni mediate da anticorpi (e quindi favorite dai Th2), come il lupus eritematoso sistemico, mentre attenua malattie autoimmuni mediate da cellule infiammatorie (e quindi Th1), come la sclerosi multipla e l'artrite reumatoide. E' quindi possibile che la diversa reattività immunitaria condizionata dai diversi livelli di ormoni sessuali possa essere un fattore in grado di influenzare l'innescò e l'evoluzione della risposta autoimmune nei maschi e nelle femmine.

Associazione con l'aplotipo HLA

Il più noto fattore genetico di predisposizione alle malattie autoimmuni è l'aplotipo HLA. Infatti, per la maggior parte di queste malattie è stata descritta l'associazione con determinati alleli HLA. L'associazione è in genere con alleli di molecole HLA di classe II, anche se in alcuni casi è stata descritta l'associazione con molecole di classe I.

Ad esempio, il rischio di sviluppo di diabete mellito insulino-dipendente è circa 20 volte maggiore in soggetti che esprimono HLA-DR3 e DR4, rispetto a soggetti che esprimono altri alleli; la probabilità di sviluppare sclerosi multipla è 5 volte maggiore nei portatori di DR2; quella di sviluppare miastenia grave è 5 volte maggiore nei portatori di DR3. L'associazione più stretta è però stata osservata nella spondilite anchilosante, il cui rischio di sviluppo è 90 volte superiore in soggetti portatori della molecola di classe I HLA-B27.

In molti casi è stato dimostrato che questa associazione può essere dovuta all'efficienza con cui le molecole predisponenti "presentano" i peptidi self responsabili di quella malattia autoimmune. E' intuitivo infatti che gli individui che esprimono molecole HLA capaci di presentare efficientemente i peptidi self verso cui si sviluppa una certa risposta autoimmune siano più predisposti allo sviluppo della malattia rispetto a soggetti che esprimono molecole MHC poco efficienti nella presentazione degli stessi.

Autoimmunità e Fas [2-11].

Un fattore genetico ereditario che è stato chiamato in causa come responsabile nello sviluppo di sindromi autoimmuni è il difetto funzionale del sistema Fas. Fas è un recettore di membrana in grado di predisporre la cellula verso la sua morte cellulare programmata,

ed è espresso da linfociti attivati, risultando quindi importante nello spegnimento della risposta immunitaria e nella deplezione delle cellule effettrici che vengono espanse durante la risposta immunitaria. Una mancata o ridotta funzionalità del sistema apoptotico Fas mediato, risulta quindi essere importante nello sviluppo di malattie autoimmuni.

L'associazione tra il sistema Fas e l'autoimmunità è stata per la prima volta osservata in topi omozigoti per i caratteri *lpr* (lymphoproliferation) e *gld* (generalized lymphoproliferative disease) portatori rispettivamente di mutazioni nel gene di Fas e FasL, i quali sviluppano un quadro autoimmune/linfoproliferativo con linfadenopatia, splenomegalia e autoimmunità a carattere sistemico, prevalentemente rivolte verso cellule del sangue. In più essi evidenziano una periferica espansione di cellule linfocitarie che mancano dei marcatori CD4 e CD8, che permettono di identificare rispettivamente le popolazioni T helper e T citotossiche, e definite per questo cellule doppie negative (DN).

L'associazione di questi caratteri con un mancato funzionamento del sistema Fas è stato successivamente confermato dallo sviluppo di sintomi simili manifestati da topi knock-out per il gene codificante per Fas.

Negli esseri umani, un simile quadro sintomatico è osservabile in pazienti affetti da ALPS (sindrome autoimmune linfoproliferativa), precedentemente conosciuta come Sindrome di Canale-Smith. ALPS è una malattia con insorgenza pediatrica i cui sintomi diagnostici sono riconducibili a: A) massicce reazioni autoimmuni prevalentemente rivolte verso cellule del sangue come anemie emolitiche, piastrinopenie, neutropenie o trombocitopenie, B) accumulo policlonale di linfociti B e T che sono causa di linfadenopatia e splenomegalia a carattere non-neoplastico e C) espansione periferica di linfociti T DN.

Dal punto di vista molecolare l'ALPS può essere diagnosticato dalla marcata resistenza dei linfociti del paziente allo stimolo apoptotico indotto dal sistema Fas.

Il sistema Fas [12-14].

Il recettore Fas (Apo1/CD95) è una glicoproteina transmembrana di 45/48 kDa di tipo I, appartenente alla famiglia dei recettori per il TNF, molecole in grado di indurre morte cellulare programmata attivando la cascata delle CASPASI (proteasi cisteina-dipendenti aspartato-specifiche). Il recettore Fas è caratterizzato da tre domini ricchi in cisteina (CRDs) nel dominio extracellulare e da una sequenza citosolica di 80 aminoacidi chiamato death domain (DD), in grado di interagire con altri domini DDs presenti su altre

proteine. Il suo ligando naturale, FasL è una proteina trimerica di superficie di tipo II, che può essere rilasciata in forma solubile tramite una digestione mediata da metalloproteasi.

Il sistema Fas/FasL è il sistema meglio caratterizzato nello spegnimento della risposta immunitaria. I linfociti T citotossici uccidono il loro bersaglio attivandone l'apoptosi grazie all'interazione fra il FasL presente sulla loro membrana plasmatica e il recettore Fas presente sulla superficie delle cellule bersaglio. Inoltre l'attivazione dei linfociti fa sì che essi comincino ad esporre grandi quantitativi di recettore Fas, diventando così suscettibili alla loro regolazione negativa da parte di altri linfociti o altre cellule che esprimono FasL.

Le caspasi [15-17].

Le caspasi sono una famiglia di proteasi in grado di idrolizzare proteine bersaglio in corrispondenza di una sequenza consenso contenente acido aspartico ed hanno un sito attivo ricco di residui di cisteina. Le caspasi sono coinvolte in differenti aspetti della morte cellulare programmata, idrolizzando precursori di citochine al fine di attivarli, innescando la propagazione di segnali apoptotici e realizzando il programma apoptotico mediante l'attivazione di processi trascrizionali e mediante scissione diretta di proteine fondamentali per la cellula. Le caspasi coinvolte nella cascata del segnale indotta da Fas, possono essere suddivise in iniziatrici, che agiscono nella prima fase del processo ed hanno effetto reversibile, ed effettrici, irreversibilmente coinvolte nel processo apoptotico.

Tutte le caspasi sono sintetizzate sotto forma di precursori inattivi (zimogeni), che vengono attivati grazie al taglio proteolitico, autocatalitico o mediato da altre caspasi, della porzione inibitoria del precursore.

Trasduzione del segnale Fas mediata [18-30].

Il segnale apoptotico indotto dal sistema Fas può essere suddiviso in due vie fra loro ben differenziate: la via estrinseca, in cui viene direttamente coinvolta l'attivazione della cascata delle caspasi da parte del recettore Fas, ed una via intrinseca, che invece coinvolge il mitocondrio.

Nella via estrinseca, il legame ligando-recettore induce la formazione di un composto trimolecolare denominato DISC (death inducing signaling complex), nel quale

Fas e la molecola adattatrice FADD (Fas associated death domain) interagiscono direttamente tramite i loro domini DD, e FADD recluta le procaspasi-8/-10 tramite un motivo di interazione proteina-proteina chiamato DED (death effector domain). La formazione del DISC permette la digestione autocatalitica delle procaspasi-8/-10 ed il rilascio delle caspasi attive sotto forma di eterotetrameri formati da due subunità grandi e due piccole. Le caspasi iniziatrici così attivate avviano la cascata del segnale fino all'attivazione delle caspasi effettrici -3,-6 e -7, che guidano il programma di morte cellulare. La caspasi-8 agisce anche da ponte per collegare la via estrinseca con quella intrinseca. Fra i suoi substrati, infatti, è presente la proteina citosolica Bid, molecola proapoptotica appartenente alla famiglia di Bcl-2, che, una volta clivata dalla caspasi-8, rilascia un frammento (tBid) in grado di traslocare nel mitocondrio e attivare il processo intrinseco. Il processo di attivazione del segnale Fas mediato è in grado, inoltre, di attivare delle sfingomielinasi acide e produrre ceramide, in grado di alterare la membrana mitocondriale, attraverso la produzione di GD3 ganglioside.

L'evento fondamentale del processo mediato dal frammento tBid e dalla ceramide è l'alterazione del potenziale della membrana mitocondriale con conseguente rilascio del citocromo *c*. Il citocromo *c* così diffuso nel citosol, si lega alla molecola adattatrice APAF-1 (apoptotic protease-activating factor-1), rendendola in grado di reclutare la procaspasi-9. Viene così a formarsi un complesso multimolecolare costituito da APAF-1, citocromo *c*, dATP e procaspasi-9 definito *apoptosoma*.

Come accade per il DISC e le caspasi-8/-10, la formazione dell'apoptosoma permette l'attivazione della caspasi-9, tramite taglio autocatalitico, e la conseguente attivazione delle caspasi effettrici .

Inibitori della trasduzione del segnale dipendente da Fas [31-41].

Molte proteine inibitrici appartenenti alle famiglie FLIP, IAP e Bcl2 agiscono sulla cascata del segnale indotta da Fas a differenti livelli della cascata. La proteina c-FLIP, con le sue due forme C-FLIPs (short) e c-FLIPl (long), interagisce con l'adattatore FADD o direttamente con la procaspasi-8 grazie a due domini DEDs (la forma long possiede anche un dominio caspasi-simile omologo a quello della caspasi-8), ma mancando di attività catalitica è in grado di bloccare la formazione del corretto DISC e quindi blocca l'attivazione della caspasi-8 stessa. Alti livelli di c-FLIP sono rilevabili in linfociti quiescenti e nelle prime fasi di attivazione sono correlate con la resistenza di queste cellule

all'induzione Fas-mediata di apoptosi. Nelle fasi più avanzate dell'attivazione linfocitaria, l'espressione basale di c-FLIP viene a calare sensibilmente, rendendo così i linfociti suscettibili all'azione del sistema Fas/FasL.

I membri della famiglia delle IAPs (c-IAP1, C-IAP2 e XIAP) agiscono sequestrando le caspasi grazie alla presenza di domini BIR (baculovirus inhibitor repeat), in particolare bloccando l'azione delle caspasi-3, -7 e -9. Tra queste molecole quella che riveste maggior interesse è XIAP che è in grado di inibire l'attivazione della caspasi-9 e bloccare l'azione della caspasi-3 già attivata.

La regolazione della cascata delle caspasi attuata dall'azione delle IAPs, è a sua volta finemente regolata tramite una proteina mitocondriale denominata Smac (DIABLO), che, in seguito a stimoli apoptotici, viene rilasciata nel citosol in contemporanea alla diffusione del citocromo *c*. In tal modo, mentre il citocromo *c* si lega ad APAF-1 e porta alla formazione dell'apoptosoma, Smac inattiva le IAPs agevolando l'attivazione delle caspasi-3 e -9.

La famiglia di Bcl-2 comprende diverse molecole ad azione anti-apoptotica (Bcl-2 e Bcl-XL) o pro-apoptotica (Bax, Bcl-XS, BAK). I vari membri di questa famiglia possono formare omodimeri (es. Bcl2/Bcl2), oppure eterodimeri, interagendo con altre molecole della stessa famiglia (Bcl2/Bax), e il grado di omeostasi che si viene a creare fra queste differenti interazioni, ne regola l'attività pro- o anti- apoptotica.

XIAP: Struttura e funzione [42-68]

XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein) e' costituita da 497 amminoacidi e con un peso molecolare di circa 56 kD, è codificata da un gene costituito da 7 esoni localizzato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq25).

XIAP è definita anche BIRC4 (Baculoviral IAP Repeat Containing 4), poiché la proteina è stata descritta per la prima volta in una particolare specie virali, quella dei Baculovirus. In questi virus la molecola agisce bloccando l'apoptosi, innescata dalle cellule come meccanismo di difesa nei confronti dell'infezione virale.

XIAP contiene due tipi di sequenze conservate: i domini BIR, localizzati nella porzione amino-terminale della molecola, e il dominio RING nella regione carbossi-terminale.

Recenti studi genetici mostrano come i tre domini BIR di XIAP siano essenziali per le funzioni inibitorie che la proteina esercita sia sulla caspasi-9 (iniziatrice), sia su quelle esecutrici -3 e -7.

La regione linker tra il BIR1 e il BIR2 è importante per il legame con caspasi-3 e -7. Gli aminoacidi della regione linker che precede il BIR2 legano il sito attivo di caspasi-3 e -7 con orientamento anti-parallelo, inibendo l'attività enzimatica di queste caspasi. Il residuo D148 risulta essere di grande importanza perché possa attuarsi tale legame.

Il meccanismo con cui XIAP è in grado di inibire anche la caspasi-9 risulta essere fondamentalmente differente da quello che coinvolge le caspasi esecutrici. XIAP interagisce con la caspasi-9 tramite una tasca idrofobica presente nel BIR3, che viene occupata dai primi quattro aminoacidi della caspasi-9 processata (subunità p12), in particolare il residuo W310 nel BIR3 risulta essere critico per tale legame. XIAP è l'unica IAP in grado di bloccare la caspasi-9.

La funzione del primo dominio BIR di XIAP è ancora sconosciuta e non esistono dati per dimostrare che tale regione possa bloccare l'azione delle caspasi; infatti, la proteina tronca, contenente solo il dominio BIR1, non è in grado di interagire con le caspasi esecutrici e, di conseguenza, non può inattivare il sistema Fas che porta all'apoptosi. Un'ipotesi attribuisce a BIR1 un'azione di stabilizzazione dell'intera proteina.

Per quanto riguarda il dominio RING di XIAP, esso sembra conferire un'attività E3-ligasica e promuovere la propria auto-degradazione, inoltre determina la degradazione proteasomica di una molecole quali caspasi-3 e Smac.

XIAP è ubiquitariamente espresso in tutti i tessuti normali e può a sua volta essere clivato dalle caspasi, soprattutto nel momento in cui i linfociti T vanno incontro ad apoptosi.

L'attività antiapoptotica di XIAP può essere soppressa da due proteine mitocondriali Smac/DIABLO e Omi/HtrA2. Queste molecole vengono rilasciate dal mitocondrio nel citoplasma durante l'apoptosi e si legano a XIAP a livello della tasca idrofobica presente sul BIR3, la stessa alla quale si lega caspasi-9, poiché la sequenza tetrapeptidica nella porzione ammino-terminale di queste molecole è molto simile a quella della subunità p12. Ciò rende il legame di queste tre molecole con XIAP mutualmente esclusivo.

XIAP e traduzione del segnale

I livelli di espressione di XIAP appaiono inoltre ben regolati a livello post-trascrizionale e la traduzione della proteina viene regolata in seguito a stress fisiologico.

Oltre al ruolo di inibitore della caspasi, XIAP interviene in altre vie di segnale della cellula. È stato dimostrato come l'espressione ectopica di XIAP attivi la via di JNK (N-terminal c-Jun Kinase) contribuendo all'effetto protettivo nei confronti dell'apoptosi, probabilmente come risultato dell'interazione di XIAP con TAB1 e ILPIP, che attivano la MAP3 kinasi TAK1. Altri studi hanno cercato di spiegare l'azione di XIAP nella via di NF-κB (transcription factor nuclear factor-κB). L'attivazione di NF-κB nelle cellule endoteliali avviene per attivazione della IκB kinasi da parte di TAK1.

Oltre a questo, Xiap risulta essere coinvolto nel differenziamento cellulare. È infatti riportato in letteratura come l'espressione di Xiap venga up-regolata durante il differenziamento dei monociti in macrofagi.

Lewis et al. hanno dimostrato che le proprietà di XIAP come inibitore delle caspasi o come molecola coinvolta nella trasduzione del segnale sono ben distinte e indipendenti l'una dall'altra.

Il modello murino di XIAP

Nel tentativo di comprendere la funzione di XIAP nelle cellule normali, sono stati generati topi in cui il gene è stato inattivato (XIAP^{-/-}). Topi knock-out per XIAP sono nati con la frequenza mendeliana attesa senza evidenti difetti fisici e l'analisi istologica su tessuti selezionati (cuore, fegato, rene, polmone e cervello) non ha evidenziato alcuna differenza rispetto ai topi wild type. Non è stata, inoltre, osservata alcuna variazione nell'apoptosi mediata da Fas. Da un punto di vista biochimico le cellule murine, private del gene per XIAP, presentano incrementati livelli di c-IAP1 e c-IAP2; questo dato suggerisce che esista un meccanismo compensatorio dell'espressione degli altri membri della famiglia, quando quella di XIAP è deficitaria.

INTRODUZIONE II

Le sindromi autoinfiammatorie [69-72].

Le febbri periodiche sono un gruppo di malattie caratterizzate da episodi ricorrenti di infiammazioni sistemiche, che durano da qualche giorno ad alcune settimane, con intervalli asintomatici di durata variabile. Le cosiddette *sindromi autoinfiammatorie* sono disordini sistemici caratterizzati da infiammazione apparentemente spontanee, in assenza di autoanticorpi ad alto titolo o linfociti T antigene-specifici, fra queste sindromi le maggiormente conosciute sono la sindrome da Iper-IgD (HIDS) e la sindrome periodica associata al recettore per il TNF (TRAPS).

L'HIDS è caratterizzata da febbre ricorrente che di solito inizia entro la fine del primo anno di vita. L'attacco febbrile è preceduto da brividi, seguiti da rapido aumento della temperatura, e termina dopo 4-6 giorni con graduale defervescenza. Può essere scatenato da vaccinazioni, infezioni virali, traumi minori e stress. L'attacco si accompagna spesso a linfadenopatia laterocervicale, dolori addominali, epatosplenomegalia, artralgie e cefalea.

Fra un attacco e l'altro i pazienti sono pressoché asintomatici, e gli attacchi si ripetono generalmente ogni 4-6 settimane, con ampia variabilità tra un paziente e l'altro. L'HIDS viene ereditata in modo autosomico recessivo e la frequenza di suscettibilità è bassa, il che spiega perché il disordine non viene osservato nei genitori e nella prole dei pazienti affetti. Il gene di suscettibilità alla HIDS si trova sul braccio lungo del cromosoma 12. Questo dato, in parallelo con la fortuita determinazione degli aumentati livelli di acido mevalonico presente nelle urine durante gli attacchi febbrili, ha portato all'identificazione di mutazioni a carico del gene della mevalonato chinasi (MK) come causa della sindrome. La maggior parte dei pazienti con HIDS è eterozigote per la mutazione nel gene della MK. Una mutazione, V3771, è presente in più dell'80% dei casi e causa una lieve riduzione della stabilità della proteina e dell'attività catalitica dell'enzima. Come una deficienza di MK possa essere responsabile di una sindrome febbrile episodica non è ancora completamente spiegato. Dati recenti hanno dimostrato che mutazioni nel gene MK influenzano la stabilità e/o la maturazione della MK stessa, in modo temperatura dipendente. Ad elevate temperature, infatti, si verifica una maggiore diminuzione dell'attività della MK, il che potrebbe spiegare l'andamento periodico della febbre.

A differenza della HIDS, la TRAPS viene ereditata in modo autosomico dominante (la mutazione interessa il gene codificante per il recettore del TNF, situato sul braccio corto del cromosoma 12), con il risultato di un ridotto clivaggio attivazione-indotto della forma mutante, e la conseguente diminuzione dei livelli sierici del recettore solubile, che potrebbe avere un ruolo chiave nell'omeostasi del TNF. La TRAPS è caratterizzata da febbre ricorrente, mialgie localizzate e lesioni cutanee dolenti al torso e alle estremità.

Gli attacchi febbrili durano almeno uno o due giorni, ma possono protrarsi per settimane. La TRAPS si differenzia dalla HIDS per la maggior durata degli attacchi febbrili nella maggioranza dei casi descritti, per la congiuntivite e per le mialgie, ma a volte il quadro clinico è molto sfumato essendo caratterizzato solo dalla ricorrenza di febbre.

Nell'ambito delle malattie infiammatorie croniche non infettive ereditarie entrano nella diagnostica differenziale anche la febbre mediterranea familiare (FMF), dovuta ad alterazioni del gene MEFV (mediterranean fever), situato sul braccio corto del cromosoma 16 e, non ancora ben caratterizzate, l'orticaria familiare da frigore (OFaF) e la sindrome di Muckle-Wells (SMW).

PREMESSE E SCOPO

Benché molto si conosca riguardo alla sindrome autoimmune linfoproliferativa, la ricerca di nuovi geni e prodotti proteici coinvolti nello sviluppo della malattia rimane un punto interessante da sviluppare. Infatti, risultano molto pochi i geni che si sono potuti associare direttamente alla malattia e che sono stati finora caratterizzati. Un ampio gruppo di casi è stato riunito in quella che viene definita ALPS 1 e che presentano tutte alterazioni geniche a carico del gene codificante per il recettore Fas, mentre nella patogenesi della sindrome ALPS 2 le alterazioni sono a carico del gene codificante per la caspasi-10.

Rimane tuttavia un grande gruppo di casi (ALPS 3), in cui le alterazioni geniche coinvolte non sono ancora state identificate. In questo ambito, il nostro laboratorio ha individuato una sindrome ALPS-simile, definita DALD (*Dianzani's Autoimmune lymphoproliferative disease*) che, pur manifestando sintomi diagnostici identici all'ALPS, manca dell'espansione periferica dei linfociti DN. Anche nei pazienti DALD non sono ancora stati identificati geni coinvolti nella patogenesi.

Pur non essendo correlati con lo sviluppo di ALPS, tuttavia, sono state identificate alterazioni a carico di geni codificanti per proteine coinvolte nella trasduzione del segnale apoptotico Fas mediato. È stato individuato un paziente, inizialmente sospetto ALPS, nel quale era presente una alterazione a carico del gene codificante per il FasL. Il paziente non è poi risultato essere affetto da ALPS per via dell'età di diagnosi (il paziente era già in età adulta) e della mancanza di molti sintomi caratteristici della malattia. Una seconda mutazione a carico invece del gene codificante per la caspasi-8, è stata invece ritrovata in un paziente affetto da immunodeficienza e i cui linfociti non rispondevano all'attivazione indotta da stimoli antigenici.

L'esistenza di tali alterazioni in proteine coinvolte nella trasduzione del segnale Fas mediato ci fa supporre che nella patogenesi di ALPS o DALD, possano essere coinvolti più fattori. Un supporto a tale idea viene direttamente dall'analisi di alcuni quadri familiari di pazienti ALPS 1. In questi quadri si può notare come il paziente abbia ereditato la mutazione per il recettore Fas in eterozigosi, da uno dei due genitori, il quale però, pur essendo resistente ad apoptosi indotta da Fas, è pur sempre sano, ed una seconda mutazione ancora sconosciuta dall'altro genitore, che, pur avendo il gene codificante per Fas non alterato, risulta essere anch'egli resistente ad apoptosi, purché sano.

Ricercando possibili geni candidati coinvolti nella patogenesi della malattia (ALPS/DALD), sono stati individuati nel nostro laboratorio due pazienti portatori di mutazioni a carico del gene codificante per XIAP, che ne alterano l'espressione o la funzionalità. L'aver, inoltre, notato che tali pazienti erano spesso soggetti a ripetuti attacchi febbrili, ha fatto sì che il nostro interesse si concentrasse sulle malattie autoinfiammatorie, quali le sindromi da febbre ricorrente. In particolare ci siamo concentrati su un gruppo di pazienti che, pur manifestando i classici quadri clinici della malattia, risultano non aver alterazioni a carico dei geni risaputi essere direttamente coinvolti in tali malattie.

Scopo del progetto di dottorato verte sull'individuazione di mutazioni o polimorfismi che possono alterare la funzionalità di proteine regolatrici, quale XIAP, e stabilire se ed in che modo tali alterazioni possono rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo di sindromi da febbre periodica.

MATERIALI E METODI

Pazienti.

Per la ricerca di geni coinvolti nell'ALPS-III sono stati reclutati in prima analisi quindici pazienti ALPS appartenenti alla popolazione italiana.

La diagnosi di ALPS è stata fatta sulla base dei seguenti criteri

- 1) presenza di citopenia autoimmune a carico di una o più linee ematologiche;
- 2) presenza di linfadenopatie croniche non maligne (due o più linfonodi ingrossati con un diametro superiore ai 2 cm) e/o splenomegalia;
- 3) deficit apoptotico di Fas *in vitro*;

I campioni di sangue periferico e di siero sono stati ottenuti dai pazienti e da controlli sani con consenso informato e lo studio è stato approvato dal locale comitato etico.

Sono stati inoltre reperiti campioni di DNA genomico di 39 pazienti affetti da sindrome da febbri ricorrenti senza mutazione nota, di 13 pazienti con HIDS, di 17 pazienti TRAPS, di 6 pazienti FMF, di 30 pazienti ALPS e 224 di controlli sani con consenso informato.

Separazione dei linfociti su gradiente di Ficoll.

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state purificate su gradiente di Ficoll. Questa metodica consiste nella stratificazione del campione di sangue su una soluzione a base di Ficoll (zucchero simile al saccarosio) ad alta densità, sottoponendo poi il campione a centrifugazione per la separazione dei tipi cellulari su gradiente. Al termine della centrifugazione risultano stratificate le differenti specie cellulari, in base alla loro massa e quindi alla capacità di migrare all'interno della matrice zuccherina. Gli eritrociti sedimentano sul fondo della provetta, la componente mononucleata del sangue rimane sedimentata subito al di sopra della soluzione di Ficoll (anello di linfociti e monociti/macrofagi), mentre la parte superiore della provetta è costituita da siero e piastrine. Una volta recuperato l'anello di linfociti ed eliminati residui di Ficoll e piastrine tramite una serie di lavaggi con PBS 1x, le cellule vengono contate su camera di Burker e sono pronte per essere poste in coltura. Le cellule vengono coltivate in

terreno RPMI 1640 (Invitrogen) addizionato del 10% di siero fetale bovino (FBS) e di IL-2 (da 2 a 10U/ml) (Sigma), necessaria a fornire gli stimoli trofici ai linfociti T. La proliferazione dei linfociti è garantita dalla presenza, nel terreno di coltura, di fitoemoagglutinina (PHA- Sigma), uno stimolo aspecifico del TCR.

Arricchimento di monociti da PBMC tramite aderenza.

Per l'arricchimento e la purificazione dei monociti da PBMC estratti da sangue periferico, viene sfruttata la capacità intrinseca di queste cellule di aderire alle superfici. I PBMC estratti vengono portati ad una concentrazione di $7,5 \times 10^6$ cellule / ml in terreno RPMI 1640 completato con 5% FBS, 10 mM HEPES e quindi lasciati incubare per 2 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione le cellule non aderenti vengono eliminate dalla coltura tramite 2 lavaggi con terreno a temperatura ambiente. I monociti rimasti adesi dopo i lavaggi, vengono staccati tramite l'utilizzo di uno *scraper* sterile, contati e quindi seminati in terreno per il differenziamento per macrofagi.

Differenziamento dei macrofagi da monociti.

I monociti vengono portati ad una concentrazione di 5×10^5 cellule/ml di terreno RPMI con 5% FBS, 10mM HEPES addizionato di 800u/ml GM-CSF (Granulocyte/Macrophages-Colony-Stimulating-Factor) (PeproTech), che ne permette il differenziamento in macrofagi. Le cellule, seminate in piastra multiwell da 24 pozzetti, vengono lasciati differenziare per 5 giorni a 37°C, ricostituendo la citochina di differenziamento al secondo giorno di coltura.

Capacità allostimolatoria dei macrofagi in coltura linfocitaria mista (MLR) e dosaggio delle citochine proinfiammatorie IL1 β e TNF- α

La capacità allostimolatoria dei macrofagi differenziati è stata valutata co-incubando gli stessi, attivati o non con LPS, con linfociti allo genici in rapporto 1:20. In particolare, 10^5 linfociti sono stati coltivati con 5×10^4 macrofagi in 200 ml di terreno RPMI completato con 10% FBS per 5 giorni. Per valutare l'avvenuta proliferazione dei linfociti in seguito alla stimolazione dei macrofagi, nelle ultime 6 ore di coltura viene

aggiunta timidina triziata $^3\text{H-TdR}$ (Amersham). I campioni vengono quindi analizzati in un contatore per emissioni β . Durante il differenziamento dei monoliti in macrofagi, sono stati recuperati 200 μl di surnatante nei giorni 3,5,7 e 7 con stimolazione LPS, ed utilizzati per la determinazione di $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL1}\beta$ prodotte. La determinazione è avvenuta tramite saggio ELISA specifico per entrambe le citochine, condotto secondo le indicazioni della ditta fornitrice (Quantikine, R&D). I risultati sono espressi come produzione relativa (citochine prodotte dalle cellule dopo stimolo LPS/ citochine prodotte della cellule senza stimolazione).

Analisi immunofenotipica.

Per tutti i campioni di sangue pervenuti è stata analizzata l'espressione di molecole di superficie tramite immunofluorescenza diretta e citometria a flusso (FACScalibur, Becton Dickinson). Le cellule sono state incubate con anticorpi monoclonali, marcati con differenti fluorocromi, diretti contro CD3, CD4, CD8, $\text{TCR}\alpha\beta$ (Becton Dickinson) e Fas/CD95 (Chemicon).

La percentuale di linfociti T CD4/CD8 doppi negativi (DN), tipicamente espansa nei pazienti ALPS, è stata valutata utilizzando anticorpi anti- $\text{TCR}\alpha\beta$ coniugato FITC, anti-CD4 coniugato PE e anti-CD8 coniugato PP. Le fluorescenze sono state analizzate con il programma CellQuest selezionando le cellule positive per l'anticorpo anti- $\text{TCR}\alpha\beta$ e, fra queste, la popolazione che risultava negativa per gli anticorpi anti-CD4 e anti-CD8.

Saggio di morte.

La morte cellulare indotta dallo stimolo di Fas o etoposide è stata valutata su linee cellulari T, ottenute da PBMC, attivati con 1 $\mu\text{g/ml}$ ($t=0$) e 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ($t=12$) di PHA e coltivate in RPMI 1640 con 10% FBS in presenza di 2 U/ml IL-2.

La funzionalità di Fas ed etoposide è stata valutata 6 giorni dalla seconda stimolazione ($t=18$ di coltura). Le cellule (5×10^4 /pozzetto) sono state incubate con mAb anti-Fas (1 $\mu\text{g/ml}$) (clone CH11, ditta Upstate) o con etoposide (2 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma) in presenza di rIL-2 (1U/ml), per minimizzare la morte cellulare spontanea, e con 5% FBS per impedirne la proliferazione.

La mortalità cellulare è stata valutata 16 ore dopo, contando le cellule vive in ciascun pozzetto mediante il test di esclusione con il Tripan Blue. Linfociti derivati da due soggetti sani sono stati inclusi in ciascun test come controllo positivo dell'esperimento.

I risultati sono stati espressi come mortalità cellulare relativa espressa in percentuale, calcolati secondo la seguente formula: $[100 - (\text{cellule vive dopo trattamento con lo stimolo di morte} / \text{cellule vive senza stimolo})] \times 100$.

Il limite superiore di normalità per la morte cellulare in risposta ad anticorpo anti-Fas o etoposide è stato definito come media + 2 Dev.St dei dati ottenuti da 80 controlli sani; i risultati che si ponevano nel range definito dalla media + 1 Dev.St e la media + 2 Dev.St sono state definite come 'borderline'.

Saggi di attività caspasi.

PBMC derivati dai pazienti sono stati coltivati in terreno RPMI 1640 con 10% FBS in presenza di 10 U/ml IL-2 e attivati con 1 µg/ml (t=0) e riattivati con 0,1 µg/ml (t=8) di PHA. Al 4° giorno dopo la ristimolazione (t=12) 6×10^6 cellule sono stati incubati con etoposide (5 µg/ml) in terreno RPMI 1640 con 5% FBS in ghiaccio per 30 minuti, successivamente trasferite a 37°C per 6 ore, quindi lavate con PBS 1x e congelate. Il pellet di cellule congelato è stato successivamente lisato con Lysis buffer (MBL), e il lisato ottenuto, utilizzato per analizzare l'attività specifica della caspasi-9. Il kit utilizzato (Caspase-9 Fluorometric Assay Kit, MBL) prevede, l'incubazione di 50 µg di lisato totale in tampone in presenza di un substrato specifico (LEHD-AFC) che, soggetto all'azione proteolitica delle caspasi, è in grado di emettere fluorescenza. La fluorescenza emessa dai campioni, a seguito di incubazione per 1 ora a 37°C, vengono rilevati tramite l'utilizzo di un fluorimetro (FluoroCount, Biorad) con filtri ad eccitazione 425 nm ed emissione 530 nm. Due o più lisati di controllo, derivati da controlli sani, sono stati analizzati in parallelo per ciascun esperimento, per definire il range di normalità. I dati sono riportati come attività relativa di caspasi-9 (attività delle cellule dopo stimolo etoposide/attività delle cellule non trattate).

Elettroforesi su gel di agarosio.

Il gel è stato preparato sciogliendo l'agarosio (1,5%) in Tampone Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1% contenente bromuro d'etidio. L'esposizione agli UV del gel permette il

rilevamento del DNA grazie alla fluorescenza emessa dall'etidio bromuro incorporato dal campione.

Estrazione da gel di agarosio.

Le bande d'interesse sono state tagliate da gel e il DNA estratto dalla matrice con il kit Perfectprep Gel Cleanup (Eppendorf).

Il kit utilizzato prevede (A) l'estrazione della banda interessata dalla matrice del gel tramite solubilizzazione dello stesso in tampone contenente Sodio Ioduro, (B) la purificazione del campione di DNA tramite legame su resina specifica a scambio ionico ed eliminazione delle impurità (agarosio, proteine, sali) tramite lavaggi con un tampone contenente etanolo e (C) eluizione del campione purificato in tampone acquoso.

Questa metodica permette la purificazione di frammenti di DNA prodotti per PCR e da reazioni enzimatiche quali digestioni e ligazioni.

Sequenziamento automatico.

I prodotti di PCR, sono stati purificati dall'eccesso di primers e di nucleotidi non incorporati, utilizzando gli enzimi Exo (1 unità) e SapI (5 unità) (ditta USB) tramite un ciclo di incubazione di 20' a 37°C e uno di 20' a 80°C.

Le reazioni di sequenziamento sono quindi state ottenute servendosi del kit specifico ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v1.1 (Applied Biosistem), dotati di dideossinucleotidi ciascuno legato ad un fluorocromo differente. Seguendo il protocollo consigliato dalla ditta, per un volume finale di reazione di 10 µl, sono stati addizionati al DNA purificato, 2 µl di BigDye Sequencing Buffer (in dotazione con il kit) , il primer (3,2 µM/µl). La reazione di sequenziamento prevede l'utilizzo del seguente programma:

96°C 1'	}	1 ciclo
96°C 10''		
50°C 5''	}	25 cicli
60°C 4'		

Il prodotto della reazione è stato purificato, al fine di eliminare gli oligonucleotidi non incorporati, mediante il kit Montage SEQ₉₆ Sequencing Reaction Cleanup (Montage). 5 µl del purificato sono stati addizionati a 10 µl di formammide e denaturati (3' a 95°C), quindi caricati su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore.

Estrazione dell'RNA e reazione di retrotrascrizione (RT-PCR).

L'RNA del controllo omozigote per il polimorfismo del gene XIAP è stato estratto con il Minikit Rneasy (Qiagen, Hilden, Germany) partendo da linfociti, seguendo il protocollo fornito con il kit.

Dopo quantizzazione spettrofotometrica con raggi U.V. alla lunghezza d'onda di 260nm, 5µg di tale RNA sono stati utilizzati come stampo per generare la prima elica di cDNA, tramite impiego del ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen).

Questa metodica consiste in una prima fase di denaturazione delle strutture secondarie dell'RNA condotta a 65°C per 5'. L'oligodT presente nella miscela è utilizzato come innesco della reazione di retrotrascrizione. Il campione viene quindi trasferito in ghiaccio, che permette l'appaiamento tra l'oligonucleotide e il suo stampo. Al campione vengono aggiunti: il Buffer di reazione 5X (compreso nel kit), il ditiotraitolo (DTT), un inibitore delle Rnasi, RNaseOUT™, e 1U di trascrittasi inversa ThermoScript™RT. L'acqua utilizzata durante la manipolazione dell'RNA è stata trattata con DietilPirocarbonato (DEPC). Il ciclo di reazione prevede 1 h a 60°C e 5' a 85°C per eliminare l'RNA.

Amplificazione del cDNA codificante per il gene XIAP polimorfico.

Per ottenere i costrutti, le due forme polimorfiche c1268A e c1268C sono state amplificate tramite PCR utilizzando oligonucleotidi specifici *forward* e *reverse*.

Data la lunghezza eccessiva del cDNA codificante per XIAP, il costrutto è stato ottenuto amplificando singolarmente due frammenti genici (il primo con gli oligonucleotidi *forward-L* e *reverse-O*, il secondo con gli oligonucleotidi *forward-P* e *reverse-Q*) con oligonucleotidi (*reverse-O* e *forward-P*) sovrappendenti.

I frammenti ottenuti, rispettivamente di 1200 bp e 450 bp, sono stati digeriti tramite enzimi di restrizione e utilizzati per una reazione di ligazione a tre con il vettore pEGFP-C2 (Clontech).

Digestione enzimatica e ligazione.

1-3 µg di DNA plasmidico e di cDNA codificante per XIAP (forma c1268A e c1268C, ottenuti mediante PCR sul cDNA del paziente) sono stati digeriti per 2 ore a 37°, in presenza degli enzimi di restrizione (1-2 U di enzima /µg DNA), il tampone specifico 10x fornito dalla casa produttrice ed acqua sterile.

Gli enzimi di restrizione utilizzati sono: EcoRI, presente al 3' de costruito, Xho presente al 5' del costruito e EcoRV interno al gene poco distante dal sito polimorfico.

I frammenti di DNA (inserti) ed il vettore, opportunamente digeriti con gli enzimi di restrizione e purificati, sono stati covalentemente legati mediante azione della T4 DNA ligasi (Invitrogen). La miscela di reazione è composta dal DNA che si vuole clonare (inserto) e dal vettore con un eccesso del primo rispetto al secondo (in rapporto 3:1), la ligasi (1-2 U di T4 DNA), il tampone 5X (fornito dalla casa produttrice dell'enzima) ed acqua sterile.

La reazione è stata condotta a 22° C per 2 ore. Per ciascuna delle reazioni enzimatiche realizzate era previsto un controllo di re-ligazione, del vettore su se stesso, in cui la miscela di reazione conteneva la ligasi, il tampone 5X, l'acqua ed il vettore digerito, ma non veniva aggiunto l'inserto.

Trasformazione batterica.

Come recipiente dei plasmidi originati, è stato utilizzato il ceppo batterico *Escherichia coli*, specie JM109, reso competente, fornito dalla ditta Promega. A 20 µl di batteri competenti è stato aggiunto il prodotto di ligazione e la miscela è stata incubata 20' in ghiaccio. L'ingresso del vettore nella cellula batterica è stato indotto con uno shock termico (37°C per 5'), quindi le cellule vengono incubate 30' in terreno liquido a 37°C al fine di fornire loro il tempo necessario a produrre acquisire la resistenza ad ampicillina (antibiotico utilizzato poi nel terreno di selezione). I batteri sono stati piastrati su piastre Petri contenenti il terreno selettivo (LB-agar-ampicillina 50 µg/ml) e lasciati crescere 12-18 ore a 37°C.

L'inserto clonato è stato controllato mediante PCR, utilizzando i primers XIAP-P e XIAP-Q (per amplificare la regione contenente il polimorfismo) sia per le colonie c1268A che c1268C, e sequenziato per verificare l'assenza di mutazioni.

Estrazione del DNA plasmidico.

Per la preparazione dei plasmidi è stato utilizzato il kit di estrazione QIAGEN Plasmid Midi (QIAGEN) che si basa sulla lisi alcalina delle cellule batteriche, cresciute in terreno selettivo contenente ampicillina a 37°C in agitazione per 12-16 ore, seguita dall'adsorbimento del DNA su di una resina a scambio ionico. Le proteine e le impurità vengono rimosse tramite lavaggio ed il DNA plasmidico purificato viene eluito mediante variazione di pH. Il DNA viene quindi concentrato e desalificato tramite precipitazione in isopropanolo e successivamente recuperato in tampone acquoso e quantizzato allo spettrofotometro.

Trasfezione transiente in cellule 293T.

Le cellule 293T (cellule embrionali renali umane) sono state coltivate in adesione in capsule Petri, in terreno DMEM + 10% FBS, in incubatore a 37°C umidificato al 5% di CO₂ fino ad ottenere una confluenza del 90-95%. Sono state trasfettate mediante lipide cationico, utilizzando il kit Lipofectamina 2000 (Invitrogen), seguendo il protocollo fornito dalla ditta. 15 µg di DNA sono stati diluiti in 500 µl di terreno Opti-MEM (terreno consigliato per ottenere un'alta efficienza di trasfezione) e lasciati incubare a temperatura ambiente per 5'. Contemporaneamente 20 µl di Lipofectamina 2000 sono stati diluiti in 500 µl dello stesso terreno e incubati a temperatura ambiente per lo stesso periodo di tempo. Le due diluizioni sono state riunite e incubate per 20' a temperatura ambiente e successivamente aggiunte goccia a goccia al terreno di coltura.

Nel nostro caso sono state effettuate tre trasfezioni in parallelo utilizzando: (A) il costrutto pEGFP-XIAP-c1268A, (B) il costrutto pEGFP-XIAP-c1268C e (C) il vettore vuoto (mock) come controllo della trasfezione.

Western Blot

Le cellule sono state lisate per estrarne le proteine totali, risospingendole in 100-150 µl di buffer di lisi cellulare (cod. BV-118-3) commercializzato dalla MBL International Corporation. Dopo un'incubazione di 30' in ghiaccio, è stata eseguita una centrifugazione a 12000 rpm a 4°C per 15'. Il surnatante così ottenuto rappresenta

l'estratto proteico che viene dosato mediante l'uso di Protein Assay (Biorad), una variante del metodo Braedford.

150 µg di proteine di estratto cellulare sono stati separati mediante SDS-PAGE su gel di poliaccrilammide al 10% secondo protocollo standard (*current protocols in molecular biology*).

I campioni sono stati quindi trasferiti su filtro di nitrocellulosa (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences) per 1,5 ore a 100V in tampone di trasferimento (Tris base 3g/l, Glicina 14,4 g/l, SDS 1 g/l, Metanolo 10%). Per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine dal gel alla nitrocellulosa, la membrana è stata colorata con Rosso Ponceau (Sigma Aldrich) e poi lavata con TBS (Tris base 24,2 g/l, NaCl 80 g/l pH 7,6) 1% Tween-20. La nitrocellulosa viene quindi saturata con una soluzione di 5% latte in polvere sciolto in TBS-T, e quindi incubata 2 ore a temperatura ambiente oppure 16 ore a +4°C con anticorpo primario specifico diluito in TBS-T 5% latte o BSA. Successivamente il filtro di nitrocellulosa è stato incubato con anticorpo secondario coniugato ad HRP (perossidasi di rafano) per 1 ora. Dopo 3 lavaggi in TBS-T, il filtro viene incubato con i substrati specifici per chemiluminescenza (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences), ed il segnale luminoso emesso dalla reazione viene utilizzato per impressionare i film da autoradiografia. Il segnale ottenuto sulle lastre impressionate rappresenta quindi le bande proteiche riconosciute dall'anticorpo primario specifico.

L'anticorpo utilizzato nell'analisi delle proteine è un anticorpo monoclonale α -XIAP (Stressgen).

Per la rivelazione degli anticorpi primari, è stato utilizzato un anticorpo anti-mouse coniugato ad HRP (Sigma).

RISULTATI

Individuazione di un polimorfismo nel gene di XIAP che associa con le sindromi autoinfiammatorie.

Sono stati sequenziati gli esoni 1-6 del gene BIRC4 (codificante per XIAP) e le rispettive giunzioni introniche in una popolazione di 39 pazienti, affetti da sindrome da febbre ricorrente in cui non è stata trovata nessuna mutazione causale (UPF – unmutate periodic syndrome), e in una popolazione di 224 controlli.

Tutti i pazienti mostravano ricorrenti episodi infiammatori con sintomi quali febbre, dolore addominale, mialgia con rash eritematosi, congiuntivite e atralgia, ma in nessuno di essi è stata riscontrata alcuna mutazione a carico di geni coinvolti nello sviluppo di Sindrome da Iper-IgD (HIDS), sindrome associata al Recettore per TNF (TRAPS) e Febbre Mediterranea Familiare (FMF). L'analisi delle sequenze ottenute ha ritrovato una variazione di senso situata nell'esone 6 in posizione 1268 del mRNA (numerazione da ATG+1) che causa un cambiamento aminoacidico in posizione 423 e sostituisce una Glutamina (Q) con una Prolina (P). Tale variazione è stata riscontrata sia nella popolazione dei pazienti che in quella dei controlli, ma la sua frequenza allelica risulta significativamente differente fra le due popolazioni. L'allele codificante per la forma 423Q risulta infatti molto più frequente nella popolazione dei pazienti rispetto ai controlli (81% contro 63%, $p=0.0123$) e conferisce un *odd ratio* pari a $OR=2.59$ (CI: 1.20-5.70) come rischio di sviluppare UPF. Sono stati ritrovati risultati analoghi anche suddividendo la popolazione fra maschi e femmine (Tabella 1).

Questi dati sembrano suggerire che la forma 423Q di XIAP possa essere considerata un fattore di rischio per lo sviluppo di UPF. Per verificare se il polimorfismo possa mostrare lo stesso effetto anche in sindromi autoinfiammatorie associate a mutazioni in altri geni, è stato sequenziato il gene BIRC4 in 13 pazienti con HIDS portatori di mutazioni nel gene MVK, in 17 pazienti TRAPS portatori di mutazioni in TNFRSF1A e 6 pazienti con FMF, portatori di mutazioni nel gene MEFV. Inoltre sono stati analizzati per la stessa variazione anche 95 pazienti con sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) in virtù del fatto che tale malattia è causata da un difetto di apoptosi dei linfociti. I risultati ottenuti hanno mostrato come in queste popolazioni non sia riscontrata nessuna differenza di frequenza dei due alleli rispetto alla popolazione di controllo (Tabella 2).

1268A>C							
		A		C		OR (95%CI)	p
	Sesso	n	%	n	%		
Controlli	Totale (n=224)	216	62.4	130	37.6		
	M (n=102)	62	60.1	40	39.2		
	F (n=122)	154	63.1	90	36.9		
UPF	Totale(n=39)	43	81.1	10	18.9	2.59 (1.20-5.70)	0.0123
	M (n=25)	20	80	5	20		
	F (n=14)	23	82.1	5	17.9		

Tabella. 1. Distribuzione della frequenza del polimorfismo c1268A/C nelle popolazioni UPF e controlli.

1268A>C							
		A		C		OR	p
	M/F	n	%	n	%		
Controlli (n=224)	102/122	216	62.4	130	37.6		
HIDS (n=13)	7/6	12	61.1	7	38.9	1.03 (0.42-2.55)	0.86
TRAPS (n=17)	8/9	17	62.5	9	37.5	1.13 (0.52-2.46)	0.93
FMF (n=6)	4/2	6	75	2	25	1.81(0.33-13.13)	0.72
ALPS (n=95)	48/47	90	63.4	52	36.6	1.03 (0.77-1.37)	0.93

Tabella. 2. Distribuzione della frequenza del polimorfismo c1268A/C nelle popolazioni HIDS, TRAPS, FMF, ALPS e controlli.

Le sequenze del gene BIRC4 hanno evidenziato altri 2 polimorfismi, in posizione 1506A>C e 1574G>C del mRNA, localizzati nella regione del 3' non tradotto, ma la loro frequenza in tutte le popolazioni dei pazienti non differisce da quella dei controlli, senza

alcuna differenza fra i sessi. Per ciascun gruppo, tutte le distribuzioni genotipiche non differiscono significativamente dall'equilibrio di Hardy-Weinberg.

La forma XIAP 423Q associa con i livelli di espressione dell'mRNA e della proteina.

Per verificare se la variazione Q423P influisce sull'espressione o la funzionalità di XIAP, sono state analizzate l'espressione della proteina stessa e la funzionalità della caspasi-9, proteina la cui attività è suscettibile di inibizione da parte di XIAP, in PBMC derivati da soggetti di controllo maschi, quindi emizigoti per le due forme 423Q e 423P.

L'espressione di XIAP è stata valutata tramite Western Blot su lisato totale e i risultati ottenuti mostrano come i soggetti portatori della forma 423Q manifestino più alti livelli della proteina (Figura 1).

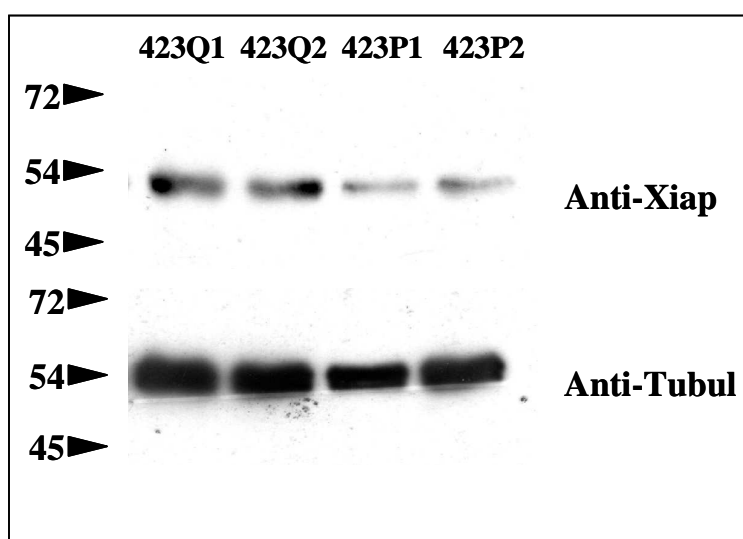


Figura. 1. Western blot rappresentativo dei vari blot condotti su lisati totali dei PBMC derivati da soggetti di controllo maschi. In figura è riportata una lastra autoradiografica impressionata utilizzando anticorpi primari diretti verso XIAP e Tubulina e anticorpi secondari anti-mouse-HRP. Per ciascun campione sono stati caricati 150 µg di lisato totale.

La rispettiva analisi densitometrica delle bande rilevate, normalizzate sulla rispettiva quantità di tubulina, rivela inoltre che tale differenza risulta essere statisticamente significativa, e che l'espressione della forma 423Q risulta essere circa 2 volte maggiore rispetto all'espressione della forma 423P (unità arbitrarie - media \pm deviazione standard: 151 ± 32 contro 81 ± 29 , $p=0.0038$) (Figura 2).

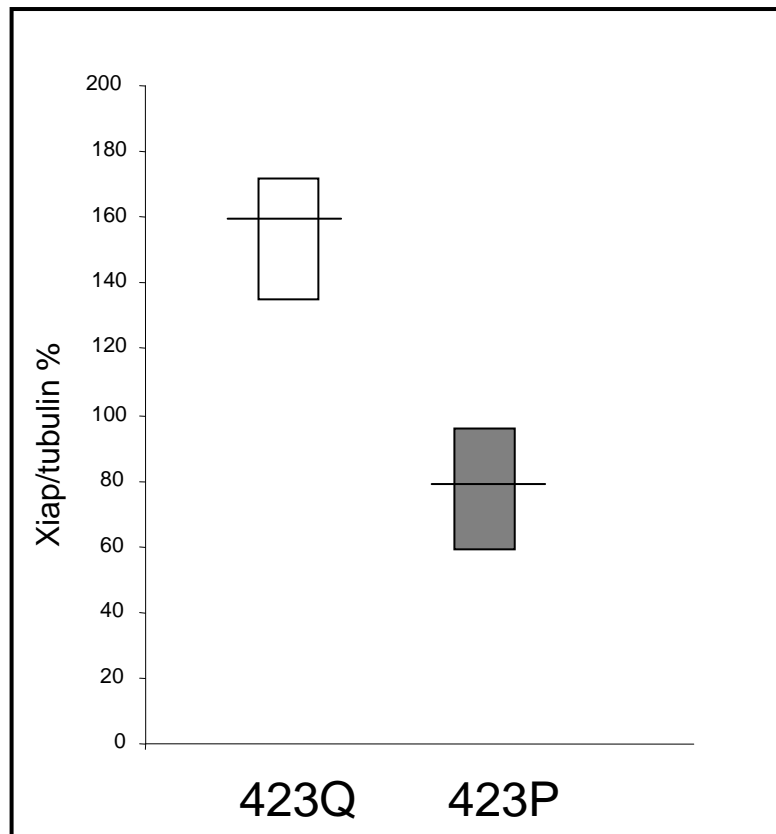


Figura. 2. Analisi densitometrica complessiva di tutti i western blot condotti sui lisati totali ottenuti da PBMC di controlli maschi. In figura è riportata la regione interquartile (box) dei valori di normalizzati della quantità di XIAP espressa nei vari soggetti. La linea orizzontale indica la mediana dei valori ottenuti.

Su simili lisati totali è stata valutata l'attività di caspasi-9 tramite saggio enzimatico fluorescente dopo aver trattato o no le cellule con etoposide, attivatore della via intrinseca dell'apoptosi e quindi di caspase-9. I risultati ottenuti hanno mostrato che i portatori della forma 423Q, quindi di più alti livelli della proteina, mostrano una significativa diminuzione dell'attività di caspasi-9 dopo stimolo (% attivazione rispetto al controllo non trattato – media \pm deviazione standard: 186 ± 49 contro 346 ± 117 , $p=0.02$) (Figura 3).

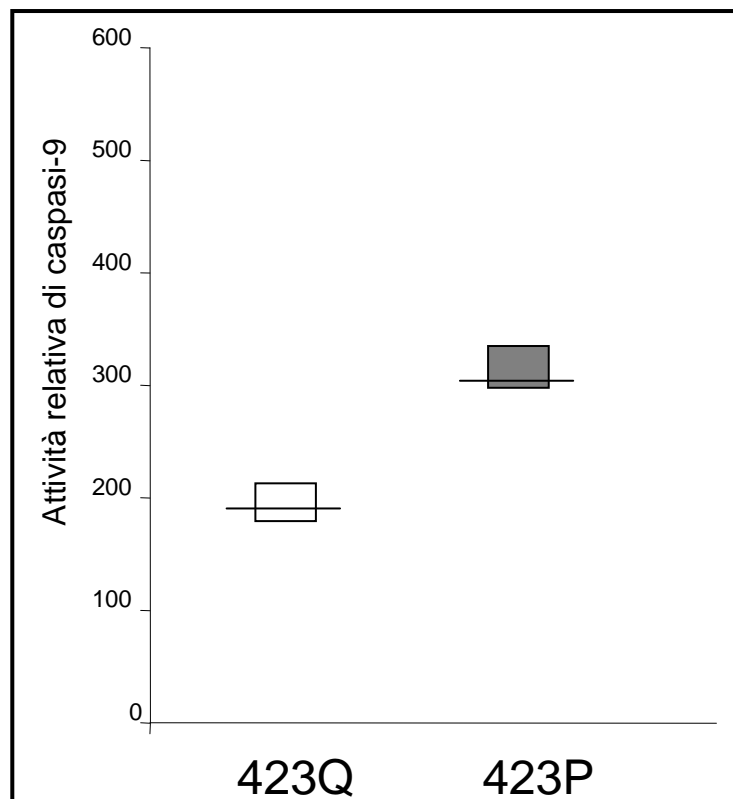


Figura. 3. Attività relativa di caspasi-9 nei soggetti di controllo maschi analizzati. In figura è riportata la regione interquartile (box) dei valori di attività relativa di caspasi-9 (vedi Materiali e Metodi) delle due popolazioni di soggetti di controllo analizzati. La linea orizzontale rappresenta la mediana dei valori.

Considerati assieme questi dati suggeriscono che la variazione Q423P non solo influenza l'espressione della proteina, ma che tale differenza ha un significativo effetto sull'attività della caspasi-9, regolata da XIAP. A conferma dei dati ottenuti su cellule derivate da prelievi di sangue periferico, le due forme 423Q e 423P sono state clonate in un vettore pEGFP di espressione eucariota e fuse con la Green Fluorescent Protein (GFP), ottenendo i costrutti GFP-XIAP-Q e GFP-XIAP-P. I due costrutti sono stati utilizzati quindi per trasfettare cellule 293T e HeLa, utilizzando come controllo di trasfezione il vettore vuoto (GFP-mock). Ventiquattro ore dopo la trasfezione, l'espressione dei costrutti è stata valutata tramite microscopia a fluorescenza e tramite Western Blot sui lisati totali delle cellule trasfettate con un anticorpo anti-GFP. Per riprodurre i dati ottenuti su PBMC i lisati ottenuti sono stati utilizzati anche per in saggio enzimatico dell'attività di caspasi-9.

I dati ottenuti dall'analisi tramite microscopia a fluorescenza e tramite Western Blot risultano concordi sul dimostrare che la forma GFP-XIAP-P risulta essere molto meno espressa rispetto alla forma GFP-XIAP-Q e alla sola espressione della GFP (Figure 4 e 5). Allo stesso modo, l'attività di caspasi-9 rilevabile per i campioni ottenuti dalle cellule

trasfettate con la forma GFP-XIAP-Q risulta essere molto inferiore a quella rilevata per i campioni corrispondenti alla forma GFP-XIAP-P (% rispetto valori medi di controllo - media \pm deviazione standard: Q:81 \pm 11 contro P:104 \pm 15, p=0.0163) e allo stesso controllo GFP (Figura 6).

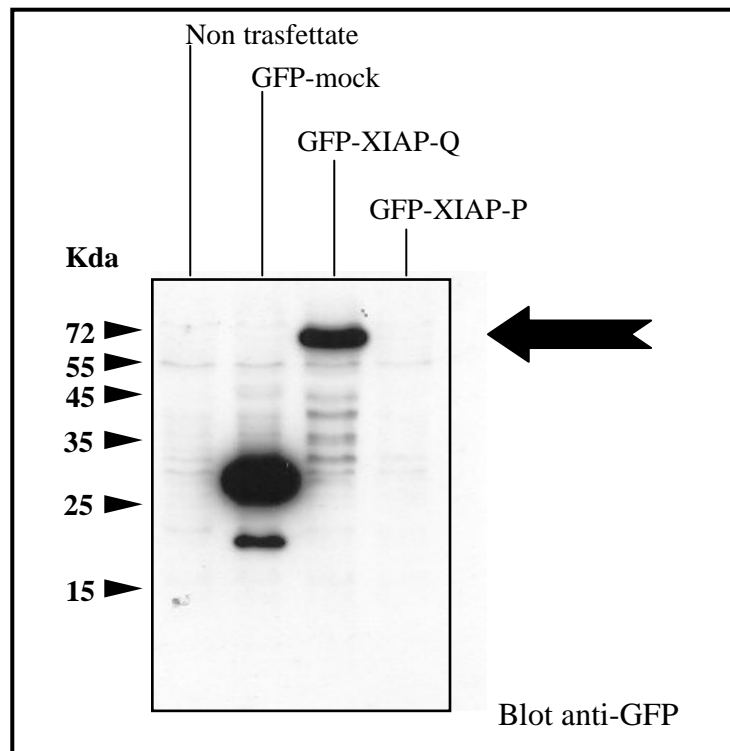


Figura. 4. Western blot sui lisati delle cellule trasfettate con i costrutti pEGFP in cui sono state clonate le due forme polimorfiche c1268A/C. Il western blot rappresentato è stato colorato utilizzando come anticorpo primario, un anticorpo monoclonale anti-XIAP, e come anticorpo secondario, un anticorpo anti-mouse coniugato con HRP. Per ciascun campione sono stati caricati 150 μ g di lisato totale.

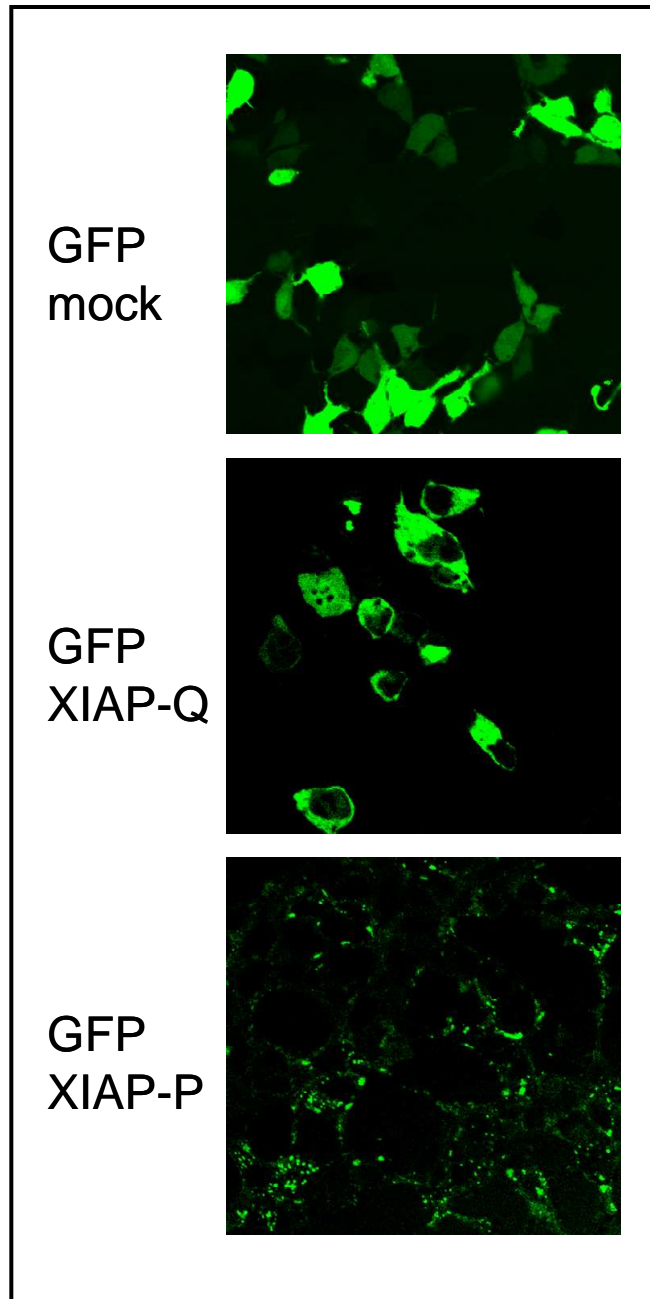


Figura. 5. Cellule 293T trasfettate con i costrutti GFP-mock, GFP-XIAP-Q e GFP-XIAP-P. La figura mostra il differente grado di espressione della forma GFP-XIAP-P rispetto alla forma GFP-XIAP-Q e al controllo.

Infine per verificare se la variazione Q423P influisce non solo sull'espressione della proteina ma anche sull'espressione del mRNA, sono state costruite mini-library BIRC4-specifiche, a partire da cDNA ottenuto da soggetti di controllo femmine eterozigoti per la variazione Q423P. Il sequenziamento di 153 cloni indipendenti di cDNA ottenuti mostra che l'espressione dell'mRNA codificante per la forma 423Q risulta essere da 1,5 a 3 volte maggiore rispetto alla sua controparte in ciascun soggetto. (p=0.0042. Tabella 3).

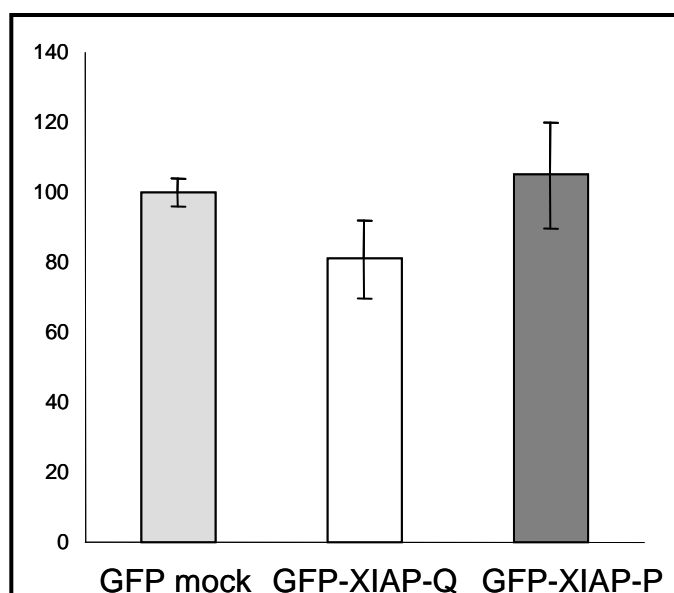


Figura. 6. Attività relativa di caspasi-9 nelle cellule trasfettate. La figura rappresenta l'attività di caspasi-9 24 ore dopo la trasfezione, espressa relativamente alla mediana dei valori ottenuti dalle cellule GFP-mock posta uguale a 100%..

Donatore	423Q	423P
1	25 (76%)	8 (24%)
2	45 (68%)	21 (32%)
3	24 (71%)	10 (29%)
4	12 (60%)	8 (40%)
TOT	106 (69%)	47 (31%)
	p=0.042	

Tabella. 3. Distribuzione dell'mRNA codificante per le forme 423Q e 423P in 4 femmine di controllo eterozigoti. La tabella riporta i valori assoluti del numero di colonie che sono risultate positive per le due forme di XIAP, fra parentesi la percentuale delle due forme in ciascun donatore.

Correlazione della variante Q423P con la funzionalità macrofagica.

I macrofagi sono cellule chiave della risposta infiammatoria e sembrano giocare un ruolo importante nella risposta infiammatoria sistemica che causa le sindromi da febbre periodica. Per questa ragione è stata analizzata la possibilità che la variazione Q423P sia in grado di influenzare la capacità di queste cellule di secernere citochine pro-infiammatorie.

A tale scopo monociti derivati da sangue periferico di soggetti maschi di controllo sono stati differenziati in macrofagi coltivandoli per 5 giorni in presenza di GM-CSF e quindi attivati o no con LPS (1 μ g/ml). Dopo 48 ore dalla stimolazione sono stati recuperati i surnatanti, utilizzati per dosare interleuchina-1 β (IL1 β) e TNF- α , mentre i macrofagi sono stati utilizzati per allestire un saggio di reazione leucocitaria mista, utilizzando PBL allo genici come cellule *responder*. L'analisi tramite saggio ELISA ha rivelato che i macrofagi derivati da soggetti portatori della variante 423Q, in assenza di stimolo attivatorio, producono livelli significativamente più bassi di TNF- α (circa 10 volte) e di IL1 β (circa 20 volte) rispetto ai macrofagi con la variante 423P; differenza che viene persa dopo aver stimolato le cellule con LPS (Figura 7). Dalla differenza dei livelli basali e il fatto che entrambe le popolazioni di cellule raggiungono livelli di secrezione paragonabili dopo stimolo LPS, si può concludere che la capacità di LPS di indurre la secrezione delle due citochine infiammatorie analizzate, rispetto alle cellule non stimolate, risulta essere molto più elevata (30 volte riguardo TNF- α e 20 volte per IL1 β) per i macrofagi portatori della variante 423Q rispetto a quelli portatori della 423P (Figura 7).

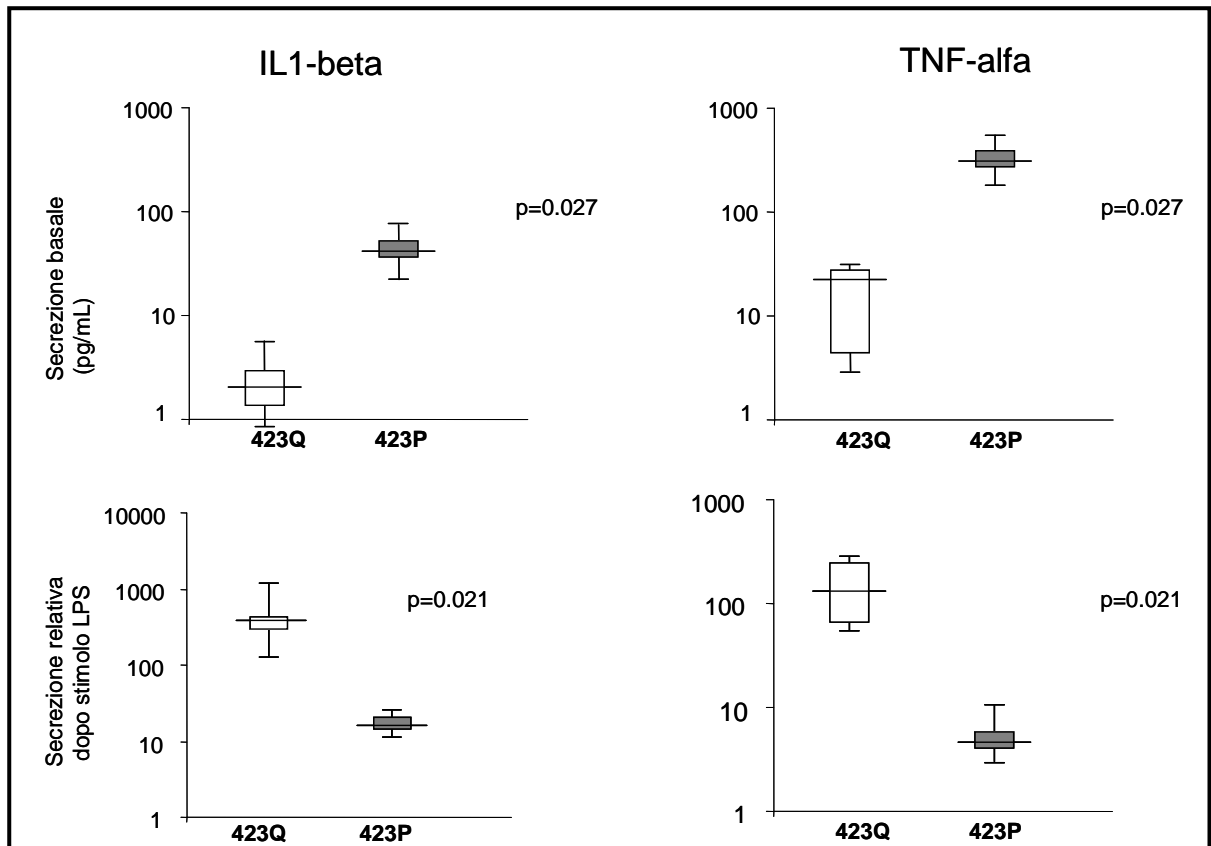


Figura. 7. Secrezione di IL1 β e TNF- α da parte dei macrofagi derivati da soggetti 423Q e 423P. I macrofagi sono stati stimolati o no con LPS e le citochine sono state dosate sui surnatanti recuperati 48 ore dopo lo stimolo. Nella parte superiore è riportata la secrezione basale delle due citochine espressa in pg/mL. Nella parte inferiore è riportato l'incremento della secrezione delle due citochine a seguito di stimolo LPS, espresso come incremento relativo rispetto ai campioni non stimolati. Il box rappresenta la regione interquartile, la linea orizzontale rappresenta la mediana e le linee verticali il 5° ed il 95° percentile.

CONCLUSIONE

In conclusione i dati descritti mostrano che un polimorfismo nel gene codificante per XIAP, situato nella regione linker fra il dominio BIR3 e il dominio RING, può agire come fattore di rischio (nella sua variante 423Q) per lo sviluppo di sindromi da febbre periodica in cui non è stata riscontrata alcuna altra mutazione causale tipica delle più studiate fra queste patologie. I dati riportati sembrano inoltre suggerire che l'associazione fra il polimorfismo e la patologia, possa dipendere dall'effetto che la variante 423Q è correlata ad un'aumentata espressione della proteina ed è in grado di influire la secrezione di citochine pro-infiammatorie dei macrofagi, in particolare di TNF- α e IL1 β .

BIBLIOGRAFIA

1. Goldsby R.A., Kindt T.J. and Osborne B.A. *Kuby Immunologia*. 2nda Edizione 2000.
2. Wu J., Zhou T., Zhang J. et al.: Correction of accelerated autoimmune disease by bearly replacement of the mutated *lpr* gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MLR-*lpr/lpr* mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91, 2344-2348, 1994.
3. Fisher GH, Rosemberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ and Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome., *Cell*, 81:935-946, 1995.
4. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome., *Ann Intern Med*, 130(7): 591-601, 1999.
5. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, et al. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*.;268:1347-1349, 1995.
6. Drappa J., Vaishnaw A.K., Sullivan K.E. et al.: Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med* 335, 1643-1649, 1996.
7. Bettinardi A., Brugnani D., Quiros-Roldan E. et al.: LD. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis. *Blood* 89, 902-909, 1997.
8. Fleisher TA, Puck JM, Strober W, Dale JK, Lenardo MJ, Siegel RM, Straus SE, Bleesing JJ. The autoimmune lymphoproliferative syndrome. A disorder of human lymphocyte apoptosis. *Clin Rev Allergy Immunol.*, 20(1):109-20, 2001.
9. Jackson CE, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr Opin Pediatr.*, 11(6):521-527, 1999.
10. Adachi M., Suematsu S., Kondo T. et al.: Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in the peripheral lymphoid organs and liver. *Nature Genet.* 11, 294-300, 1995.

11. Choi Y, Ramnath VR, Eaton AS, Chen A, Simon-Stoos KL, Kleiner DE, Erikson J, Puck JM. Expression in transgenic mice of dominant interfering Fas mutations: a model for human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol.*, 93(1):34-45, 1999.
12. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.*;267:1449-1456, 1995.
13. O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today.* 20(1):46-52, 1999
14. Peter M.E., Scaffidi C., Medema J.P., Kischkel F.C. and Krammer P.H. The death receptors in apoptosis: biology and mechanisms. *Results and Problems in Cellule Differentiation.* Vol. 23 S. Kumar. Ed. Springer-Verlag, Heidelberg. p. 25, 1999.
15. Pan G, Bauer J.H., Haridas V., Wang D., Liu D., Yu G., Vincenz C., Aggarwal B.B., Ni J., and Dixit S. Identification and functional characterisation of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett.* 431:351, 1998.
16. Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien, RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science.*, 288(5475):2354-2357, 2000.
17. Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M. et al.: Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189-1192, 1995.
18. Gomez-Angelats M, Cidlowski JA. Protein Kinase C Regulates FADD Recruitment and Death-inducing Signaling Complex Formation in Fas/CD95-induced Apoptosis. *J Biol Chem.* 276(48):44944-44952, 2001.
19. J.P. Medema, C. Scaffidi, F.C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter, FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC), *The EMBO Journal* 16 n. 10: 2794-2804, 1997.
20. M. Los, C. Stroh, R. U. Janiche, I. H. Engels, K. Schulze-Osthoff Caspases: more than just killers? *Trends in Immunology* Vol.22 No.1, 2001.
21. Hofmann TG, Moller A, Hehner SP, Welsch D, Droge W, Schmitz ML. CD95-induced JNK activation signals are transmitted by the death-inducing signaling complex (DISC), but not by Daxx. *Int J Cancer.* 93(2):185-191, 2001.
22. Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* 276(23), 2001.

23. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 81(4):505-512, 1995.
24. S. Desagher, J.C. Martinou, Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trend in Cell Biology* (vol. 10), 2001.
25. De Maria R., Lenti L., Malisan F. et al.: Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 277, 1652-1655, 1997.
26. De Maria R, Rippo MR, Schuchman EH et al.: Acidic sphingomyelinase (ASM) is necessary for fas-induced GD3 ganglioside accumulation and efficient apoptosis of lymphoid cells. *J Exp Med* 187, 897-902, 1998.
27. Hu Y., Benedict M.A., Wu D. et al.: G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4386-4391, 1998
28. Li P., Nijhawan D., Budihardjo I. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489, 1997.
29. C. Scaffidi, S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tommaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer, M.E. Peter, Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways, *The EMBO Journal* 17 n.6: 1675-1687, 1998.
30. Chiocchetti A., Dianzani U. Role of Fas defects in autoimmunity. *Res. Adv. In Blood*,2001.
31. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. Aug 1;13(15):1899-911, 1999.
32. Pan G., O'Rourke K., Dixit V.M.: Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 273, 5841-5845, 1998.
33. Cheng E.H., Kirsch D.G., Clem R.J. et al.: Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966-1968, 1997.
34. Deveraux Q.L., Roy N., Stennicke H.R. et al.: IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17, 2215-2223, 1998.
35. Seshagiri S., Miller L.K.: Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13606-13611, 1997.
36. Roy N., Deveraux Q.L., Takahashi R. et al. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16, 6914-6925, 1997.

37. Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S. et al. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304, 1997.
38. Ambrosini G., Adida C., Altieri D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917-921, 1997.
39. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*;102(1) :33-42, 2000.
40. Verhagen A.M et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*;102:43-53, 2000.
41. Wu G, Chai J, Suber TL, WU JW, Du C, Wang X, Shi Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO *Nature.*; 408(6815):1008-1012, 2000.
42. Lagace M. Xuan JY. Young SS. McRoberts C. Maier J. Rajcan-Separovic E. Korneluk RG. Genomic organization of the X-linked inhibitors of apoptosis and identification of a novel testis-specific transcript. *Genomics* 77: 181-188, 2001.
43. Duckett CS. Nava VE. Gedrich RW. Clem RJ. Van Dongen JL. Gilfillan MC. Shiels H. Hardwick JM. Thompson CB. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 15: 2685-2694, 1996.
44. Farahani R, Fong WG, Korneluk RG, MacKenzie AE. Genomic organization and primary characterization of miap-3: the murine homologue of human X-linked IAP. *Genomics*. 1997 Jun 15;42(3):514-8.
45. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*. 1996 Jan 25;379(6563):349-53.
46. Deveraux QL. Leo E. Stennicke HR. Welsh K. Salveen GS. and Reed JC. Cleavage of Human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 18: 5242-5251, 1999.
47. Takahashi R. Deveraux Q. Tamm I. Welsh K. Assa-Munt N. Salvesen GS. and Reed JC. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 273: 7787-7790, 1998.
48. Johnson DE, Gastman BR, Wieckowski E, Wang GQ, Amoscato A, Delach SM, Rabinowich H. Inhibitor of apoptosis protein hILP undergoes caspase-mediated cleavage during T lymphocyte apoptosis. *Cancer Res*. 2000 Apr 1;60(7):1818-23.

49. Chai J. et al. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104: 769-780, 2001.
50. Riedl SJ. et al. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104: 791-800, 2001.
51. Huang Y. et al. Structural basis of caspase inhibition by XIAP. Differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104 : 781-790, 2001.
52. Sun C, Cai M, Gunasekera AH, Meadows RP, Wang H, Chen J, Zhang H, Wu W, Xu N, Ng SC, Fesik SW. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature*. 1999 Oct 21;401(6755):818-22.
53. Bratton SB, Lewis J, Butterworth M, Duckett CS, Cohen GM. XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95- and Bax-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2002 Sep;9(9):881-92.
54. Datta R. Oki E. Endo K. Biedermann V. Ren J. and Kufe D. XIAP regulates DNA damage-induced apoptosis downstream of caspase-9 cleavage. *J Biol Chem* 275: 31733-31738, 2000.
55. Hinds MG, Norton RS, Vaux DL, Day CL. Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol*. 1999 Jul;6(7):648-51.
56. Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*. 2000 May 5;288(5467):874-7.
57. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8662-7. Epub 2001 Jul 10.
58. Holcik M. Korneluk R. XIAP, the guardian angel. *Mol Cell Biol* 2: 550-556, 2001.
59. MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem*. 2002 Sep 27;277(39):36611-6. Epub 2002 Jul 16.
60. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):33-42.
61. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that

- promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):43-53
62. Hegde R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):432-8. Epub 2001 Oct 17.
 63. Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):439-44. Epub 2001 Oct 15.
 64. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*. 2001 Sep;8(3):613-21.
 65. Saelens X, Matthijssens F, Schotte P, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. Caspases are not localized in mitochondria during life or death. *Cell Death Differ*. 2002 Nov;9(11):1207-11.
 66. Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*. 2000 Dec 21-28;408(6815):1004-8.
 67. Lin H, Chen C, Chen B.M. Resistance of bone marrow-derived macrophages to apoptosis is associated with the expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in primary culture of bone marrow cells. *Biochem*. 2001, 353 – 299/306.
 68. Miranda M.B, Dyer K.F, Grandis J.R, Johnson D.E. Differential activation of apoptosis regulatory pathways during monocytic vs granulocytic differentiation: a requirement for Bcl-X_L and XIAP in the prolonged survival of monocytic cells. *Leukemia* 2003, 17- 390/400
 69. Dod C, Cuisset L, Delpech M, Grateau G. TNFRSF1A-associated periodic syndrome (TRAPS), Muckle-Wells (MWS) and renal amyloidosis.
 70. Centola M, Aksentijevich I, Kastner D.L. The hereditary periodic fever syndrome: molecular analysis of a new family of inflammatory diseases. *Human Molecular Genetics*. 1998 Vol. 7, No 10 review: 1581-88.
 71. Houten S.M, Frenkel J, Rijkers G.T, Wanders R, Kuis W, Waterham H.R. Temperature dependence of mutant mevalonate kinase activity as a pathogenic factor

in Hyper-IgD and periodic fever syndrome. . *Human Molecular Genetics*.2002 Vol. 11, No 25: 3115-24.

72. Frenkel J, et al. Clinical and molecular variability in childhood periodic fever with hyperimmunoglobulinaemia D. *Rheumatology* 2001;40:579-584.

PRIMO ANNO

Corsi/Congressi seguiti:

- “Corso di Elettroforesi Bidimensionale”. 28/29 settembre 2004. Palazzo LITA, Istituto Tecnologie Biomediche Avanzate (ITBA), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Fratelli Cervi 93, Segrate (MI).

Seminari seguiti.

- 3-5-04 “Genetic bases of the ALPS subtypes”, Frederic Rieux-Laucat;
- 11-5-04 “Seminario conclusivo del corso di bioetica”, Università degli Studi di Milano;
- 20-5-04 “Le artriti croniche del bambino”, Alberto Martino;
- 28-5-04 “Il reticolo endoplasmatico: un labirinto metabolico”, Angiolo Benedetti;
- 11-6-04 “Virus e malattie autoimmuni”, Antonio Puccetti;
- 14-6-04 “Biomedical discovery using microarray: principles, prospects and problems”, David Murphy;
- 14-6-04 “Pitfalls of genetic studies in liver diseases”, Christopher Day;
- 15-6-04 “Functional genomics of hypothalamic homeostatic plasticity”, David Murphy.

SECONDO ANNO

Corsi/Congressi seguiti:

- XXVII National Congress S.I.P. 20-23 Febbraio 2005. MODENA. *Le basi molecolari delle malattie.*
- Corso di Statistica. Coordinatore Prof. Magnani;
- Corso di Lingua Inglese. Prof. Colin Irving-bell

Seminari seguiti.

- 2-12-04 “Repertaxin, un nuovo inibitore di IL-8: risultati preclinici e identificazione del meccanismo d’azione”, Riccardo Bertini;
- 11-3-05 “Proteomica dell’epitelio intestinale”, Margherita Ruoppolo;
- 21-3-05 “Sclerosi multipla: ricerca di geni di suscettibilità nella popolazione finlandese”, Rosanna Asselta;
- 23-3-05 “Le cellule dendritiche, un giocatore chiave nella risposta immunitaria: quali e quanti tipi?”, Stefania Nicola;
- 6-4-05 “Toward regulation of gene expression by chromatin modification: some biomedical model”, Gerardo Lopez-Rodas;
- 30-5-05 “Il dolore articolare: un problema chimico o biochimico?”, Giampiero Pescarmona;
- 1-6-05 “Geni e trapianti”, Antonio Amoroso;
- 10-6-05 “Seminario di proteomica – 2Delettrophoresis, from sample to DIGE application”, Amersham Biosciences;
- 17-6-05 “La tossina della pertosse ed il suo B-oligomero: nuovi farmaci immunostimolanti e anti-HIV”, Guido Poli;
- 15-7-05 “Meccanismi molecolari del Parkinson disease”, Stefano Gustincich;
- 12-9-05 “Caratteristiche e potenzialità delle cellule isolate dalle membrane fetali umane: amnion e corion”, Ornella Parolini

Pubblicazioni.

- Comi C, Gaviali P, Leone M, Ferretti M, Castelli L, Mesturini R, Ubezio G, Chiocchetti A, Osio M, Muscia F, Bogliun G, Corso G, Gavazzi A, Mariani C, Cantello R, Monaco F, Dianzani U. Fas-mediated cell apoptosis is impaired in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy.

Peripheral nervous system – 2006 Mar;11(1): 53-60

TERZO ANNO

Corsi/Congressi seguiti:

- XXVI European Congress of Immunology. 6-9 Settembre 2006. PARIGI. *First Joint meeting of European National Societies of Immunology.*

Seminari seguiti.

- 18-11-05 “Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits”, Diego Cotella;
- 23-11-05 “HCV-related steatosis: pathogenic mechanism and clinical applications”, Luigi Adinolfi;
- 25-11-05 “Mechanism of transcriptional regulation and diseases”, Robert Tijan;
- 19-1-06 “Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation”, Maria Grano;
- 13-2-06 “New perspectives in metabotropic glutamate receptors”, Ferdinando Nicoletti;
- 15-2-06 “Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico”, Daniele Sblattero;
- 13-3-06 “Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell’emofilia”, Atonia Follenzi;
- 20-3-06 “The natural course of preclinical type 1 diabetes”, Mikael Knip;
- 6-4-06 “Aspetti immunologici e terapeutici della “hairy cell leukemia”, Francesco Forconi;
- 4-5-06 “Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale”, Luciano Mutti;
- 18-5-06 “L’epatite autoimmune”, Marco Lenzi;

- 30-5-06 “Sperm mediated gene transfer: storia e applicazioni”, Maria Luisa Lavitrano;
- 27-6-06 “Osteointegrazione e superfici implantari” Lia Rimondini;
- 5-7-06 “DNA and protein array in infection diseases: from basic research to vaccine design”, Renata Grifantini;

Pubblicazioni.

- Clementi R, Chiocchetti A, Cappellano G, Cerutti E, Ferretti M, Orilieri E, Dianzani I, Ferrarini M, Bregni M, Danesino C, Bozzi V, Putti MC, Cerutti F, Cometa A, Locatelli F, Maccario R, Ramenghi U, Dianzani U. Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood* 2006, May 23 [Epub. Ahead of print]
- Mesturini R, Nicola S, Chiocchetti A, Seren-Bernardone I, Castelli L, Bensi T, Ferretti M, Comi C, Dong C, Rojo J.M, Yagi J, Dianzani U. ICOS cooperates with CD28, IL-2, and INF- γ and modulates activation of human naive CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol.* 2006 Oct.;36(10):2601-12.

QUARTO ANNO

Corsi/Congressi seguiti:

- V Congresso Nazionale della Società Italiana di Immunologia, Immunologia clinica e Allergologia (SIICA). Trieste 6-9 Giugno 2007.

Abstract a congressi:

- *A CD38-derived peptide as a potential antiretroviral agent exploiting cellular mechanisms of antiviral defense.* Andrea Savarino, Thea Bensi, Massimo Ferretti, Umberto Dianzani. V Congresso Nazionale della Società Italiana di Immunologia, Immunologia clinica e Allergologia (SIICA). Trieste 6-9 Giugno 2007.

Seminari seguiti.

- 10-1-07 “Gene silencing by RNA interference (RNAI)” Prof.ssa P. DeFilippi
- 17-1-07 “Detection of miRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3’-UTR regions” Prof. M. Caselle
- 18-1-07 “Patogenesi del Diabete Mellito di Tipo I: stiamo vincendo o stiamo perdendo?” Prof. G.F. Bottazzo
- 1-2-07 “Gene therapy strategies for phenylketonuria” Prof. B. Thöny
- 22-2-07 “Fragile X syndrome from RNA metabolism impairment to spine dysmorphogenesis” Prof. C. Bagni
- 9-2-07 “Vita, opere e miracoli dell’epatocita” Prof. M Tripodi
- 14-3-07 “Protein microarrays development of new supports for improved sensitivity” Dr. M. Cretich
- 15-3-07 “Colangiopatie autoimmuni” Prof. M. Podda
- 16-3-07 “Microarrays di tessuti: una strategia per identificare nuovi biomarcatori tumorali” Dott.ssa M. Capra
- 16-3-07 “Drosophila as a model for aging and cancer” Dott: Bohmann

- 29-3-07 “Marcatori farmacogenetici nel carcinoma coloretale: quali terapie per una terapia personalizzata?” Prof. E. Mini
- 12-4-07 “Relazione tra struttura e funzione delle proteine mediante analisi del Protein Data Base” Prof. Milanesio
- 16-5-07 “Difetti genetici del pre-B cell receptor” Prof. Ferrari
- 25-5-07 “The regulation of hematopoietic stem cells by SMAD signalling” Dott. Karlsson
- 28-5-07 “Translating basic science into therapeutic strategies for Shwachmann Diamond Syndrome” Dott. Ellis
- 4-6-07 “Sindromi autoinfiammatorie” Prof. A Martini
- 21-6-07 “Bioinformatics tools for the analysis of UTRs and the prediction of alternative splice site” Prof. E Mignone

Pubblicazioni.

- DeFranco S, Chiocchetti A, Ferretti M, Castelli L, Cadario F, Cerutti F, Rabboni I, Indelicato M, Mazzarino C, Chessa M, Bona G, Dianzani U. Detective function of the Fas apoptotic pathway in Type I diabetes mellitus correlates with age at onset. *Int J Immunopathol Pharmacol In press.*
- Zavattaro E, Azzimonti B, Mondini M, DeAndrea M, Borgogna C, Dell’Oste V, Ferretti M, Nicola S, Cappellano B, Carando A, Leigheb G, Landolfo S, Dianzani U, Gariglio M. Identification of detective Fas function and variation of Perforin gene in an Epidermodysplasia Verruciformis patient lacking EVER1 and EVER2 mutations. *Journal of Investigative Dermatology. In press.*