

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



**Dottorato di Ricerca  
in  
Medicina Molecolare  
*XXI ciclo***

**Relazione III° anno**

**TITOLO:**

**Visualizzazione dell'attivazione di Src chinasi nei diversi  
compartimenti di membrana dei linfociti T mediante l'utilizzo  
di biosensori FRET**

**Candidata: ELISA CERUTTI**  
*Tutor: Prof. Umberto Dianzani*

## INTRODUZIONE

I linfociti T svolgono un ruolo centrale nella risposta immunitaria, sia come cellule effettrici sia come cellule regolatorie in grado di modulare le funzioni di numerosi altri tipi cellulari. Questa funzione regolatoria viene svolta attraverso il contatto diretto cellula-cellula o attraverso la secrezione di varie citochine. In tal modo il corretto funzionamento delle cellule T è essenziale per il mantenimento della normale omeostasi all'interno e al di fuori del sistema immunitario. Viceversa, anomalie nella loro funzione possono portare allo sviluppo di malattie immunologiche, ad esempio, autoimmunità, allergie o immunodeficienze.

L'evento principale che porta all'attivazione e alla differenziazione dei linfociti T maturi è il legame tra il loro recettore antigene-specifico (TCR) con il ligando specifico, che consiste in un peptide processato e presentato, in associazione con molecole MHC, dalle cellule presentanti l'antigene (APC). Questo evento porta all'attivazione di numerosi pathway di trasduzione del segnale che coinvolgono secondi messaggeri, protein-chinasi, fosfatasi e altri enzimi e mediatori chiave (Mustelin et al., 1990; June et al., 1990; Altman et al., 1990; Klausner et al., 1991). Questa cascata di segnalazione culmina con l'induzione della trascrizione di geni specifici e la successiva differenziazione e proliferazione di queste cellule.

### **Compartimentalizzazione di membrana e trasduzione del segnale**

Le membrane plasmatiche di molti tipi cellulari, inclusi i linfociti T, contengono microdomini specializzati, o Lipid Rafts, contenenti sfingolipidi, colesterolo, sfingomieline e proteine glicosilfosfatidilinositolo-associate. Questi domini di membrana sono caratterizzati dall'essere insolubili alla lisi con particolari detergenti a basse temperature (Triton, Brij98 etc).

I lipid rafts giocano un ruolo fondamentale nel trafficking di membrana e nella trasduzione di segnale. Durante la formazione della sinapsi immunologica, in seguito alla formazione del complesso TCR-MHC-peptide, i lipid rafts sulla superficie dei linfociti T reclutano varie proteine, tra cui CD2, CD3, CD4, CD28 e TCR (Ohtani et al., 2000), insieme ad alcune protein-chinasi, come Lck, Fyn, PI-3K (Hope and Pike, 1996; Simons and Ikonen, 1997; Zhang et al., 1998), a proteine adattatrici, come LAT (Montixi et al., 1998; Zhang et al., 1998). Vengono reclutate anche alcune protein-fosfatasi, come SHP-1. I lipid rafts rappresentano quindi una piattaforma per la trasduzione del segnale TCR-mediato (Harder and Simons, 1999; Janes et al., 1999; Pizzo and Viola, 2003).

### **Attivazione dei linfociti T e protein-chinasi implicate (PTKs)**

L'elemento chiave per l'attivazione del linfocita T in seguito al riconoscimento dell'antigene è un recettore complesso, costituito dalle due subunità eterodimeriche  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  del TCR e da CD3. La funzione delle subunità  $\alpha\beta$  e  $\gamma\delta$  del TCR è quella di riconoscere e legare specificatamente i peptidi antigenici presentati dalle molecole MHC, mentre il complesso CD3,  $\zeta$  e  $\eta$  trasduce il segnale generato dal legame dell'antigene con il TCR. Le varie catene associano non-covalentemente a formare un recettore completo e funzionale.

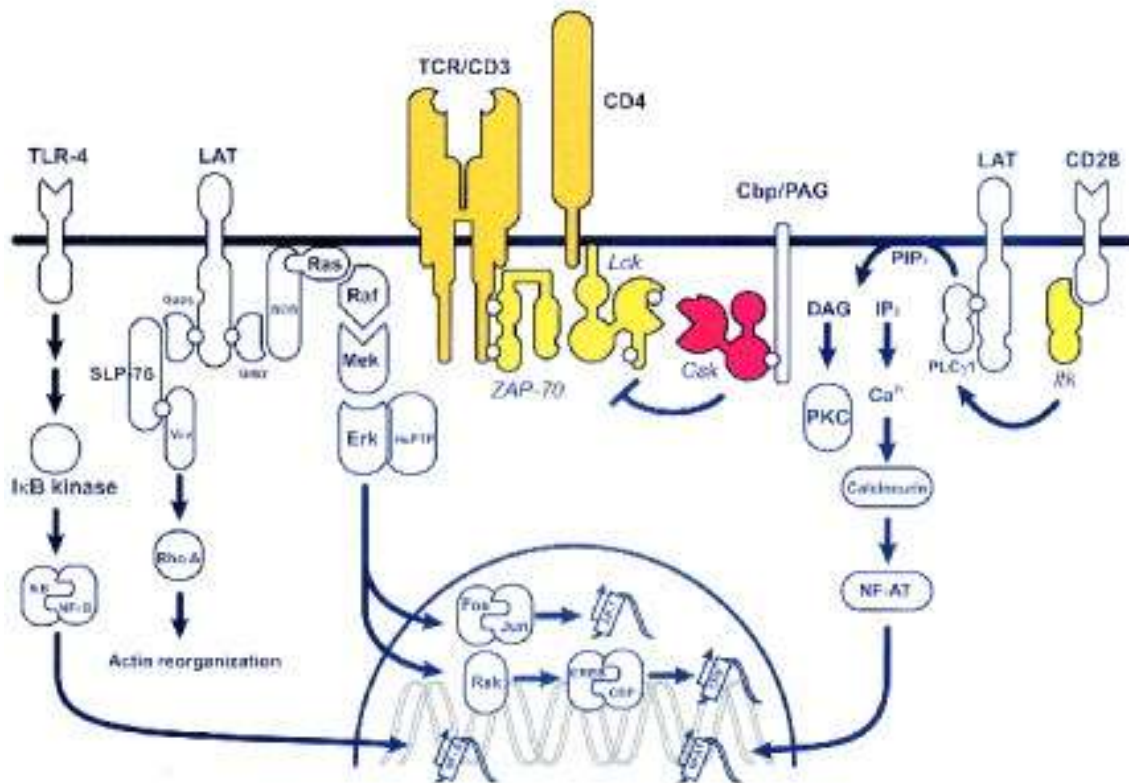
L'identificazione di un certo numero di PTKs e di molti dei loro substrati, e la comprensione della sequenza di eventi che porta alla attivazione di diversi pathway a valle, ha rappresentato un passo importante per la comprensione del signalling del TCR. Negli ultimi 10 anni, è anche diventato chiaro che molti altri recettori della superfamiglia immunoglobuline utilizzano un analogo meccanismo di trasduzione del segnale, che coinvolge PTKs tra cui Src, Syk, Csk e Tec, proteine adattatrici ed enzimi coinvolti nella tirosin-fosforilazione (Figura 1). È importante notare, tuttavia, che questa cascata è anche altrettanto dipendente dalla classe di enzimi che rimuove il fosfato dai substrati PTK, le protein-tirosina-fosfatasi. (PTPases).

## **Inizio del signalling del TCR**

È generalmente accettato che l'evento chiave nell'attivazione delle cellule T, in seguito al riconoscimento dell'antigene, è l'aumento della fosforilazione in tirosina dei domini ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) del TCR, ad opera di membri della famiglia delle Src-chinasi come Lck e Fyn. Lck è considerata la chinasi responsabile della maggior parte della fosforilazione di ITAM che segue l'attivazione del TCR nei linfociti T. La fosforilazione di ITAM è sottoposta ad un rapido turn-over nelle cellule T. L'aumentata fosforilazione di ITAM è il risultato di aumentata attività chinasi e ridotta attività fosfatasi. Evidenze suggeriscono che CD45 possa essere coinvolto nella defosforilazione della catena  $\zeta$  (Furukawa et al., 1994). È stato anche proposto che la protein-fosfatasi SHP1 (Src homology 2 (SH2)-domain containing protein) possa catalizzare questa reazione.

Sembra che lo scopo principale della fosforilazione di ITAM sia quello di creare siti di legame per i domini SH2 della ZAP-70-chinasi e di altre Syk chinasi. (Sloan-Lancaster et al., 1994; Madrenas et al., 1995; La Face et al., 1996). Una volta reclutata, ZAP-70 è attivata dalla fosforilazione in tirosina (Tyr-493) ad opera di Lck (Chan et al., 1995; Wange et al., 1995). In seguito, la fosforilazione di molecole di ZAP-70, crea siti di legame per altre proteine di segnale contenenti il dominio SH2 (Neumeister et al., 1995; Katzav et al., 1994; Couture et al., 1994; Duplay et al., 1994). La famiglia delle Src-chinasi è responsabile del reclutamento e dell'attivazione di un'altra classe di chinasi (PTKs) citoplasmatiche, le Tec-chinasi Itk/Emt e Txk/Rlk, che sono direttamente coinvolte (Figura 1) nella fosforilazione e l'attivazione della fosfolipasi C (Li et al., 1998; Perez-Villar., 1999).

L'aumento della fosforilazione dei substrati delle PTKs conduce alla attivazione di molti percorsi di segnalazione, a cambiamenti morfologici e funzionali, alla progressione del ciclo cellulare e alla attivazione di numerosi geni (Figura 1).



**Figura 1** Pathways intracellulari di e chinasi coinvolte nell'attivazione dei linfociti T. L'attivazione del TCR e il legame con CD4 libera Lck dall'inibizione di Cks, portando alla fosforilazione del TCR e al successivo reclutamento e attivazione di ZAP-70. L'attivazione di questa induce la fosforilazione di LAT (linker per l'attivazione delle cellule T). LAT quindi lega la fosfolipasi  $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) attivando i pathways di Ca<sup>2+</sup>/InsP<sub>3</sub>(IP<sub>3</sub>), Ras/Raf/Erk e RhoA, con conseguente regolazione della trascrizione genica e proliferazione.

## **Proteine fluorescenti e FRET**

Dal momento della sua scoperta (Shimomura et al., 1962), GFP (Green fluorescence protein) ed i suoi derivati hanno fornito potenti strumenti per biologia cellulare. Sono stati infatti ampiamente utilizzati per generare proteine di fusione con lo scopo di monitorare la posizione di queste nelle cellule vive.

Lo sviluppo di mutanti funzionali di GFP e RFP, di piccole sonde fluorescenti e il miglioramento della microscopia a fluorescenza hanno reso possibile la visualizzazione, la quantificazione, e la manipolazione della trasduzione di segnale in cellule vive, con una alta risoluzione temporale e spaziale (Tour et al., 2003; Tsien, 1998; Zhang et al., 2002). In particolare, la FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) è stata ampiamente utilizzata per monitorare in vivo l'attivazione della trasduzione di segnale.

Ma che cos'è la FRET?

Quando due fluorocromi sono in prossimità e lo spettro di emissione di uno (donatore) si sovrappone con lo spettro di eccitazione dell'altro (accettore), l'eccitazione del donatore causa un sufficiente trasferimento di energia da portare all'emissione dell'accettore.

L'efficienza della FRET dipende dal relativo orientamento e dalla distanza tra i fluorocromi (Tsien, 1998). Pertanto, qualsiasi modifica nell'orientamento o distanza tra i due fluorocromi può modificare l'efficienza di FRET. Sono stati generati una vasta gamma di FRET-biosensori per visualizzare la concentrazione di calcio, le interazioni proteina-proteina e l'attività di chinasi (Miyawaki et al. 1999, 1997; Mochizuki et al., 2001; Persechini e Cronk, 1999; Sato et al. 2002; Ting et al., 2001; Truong et al., 2001; Violin et al., 2003; Zhang et al., 2001).

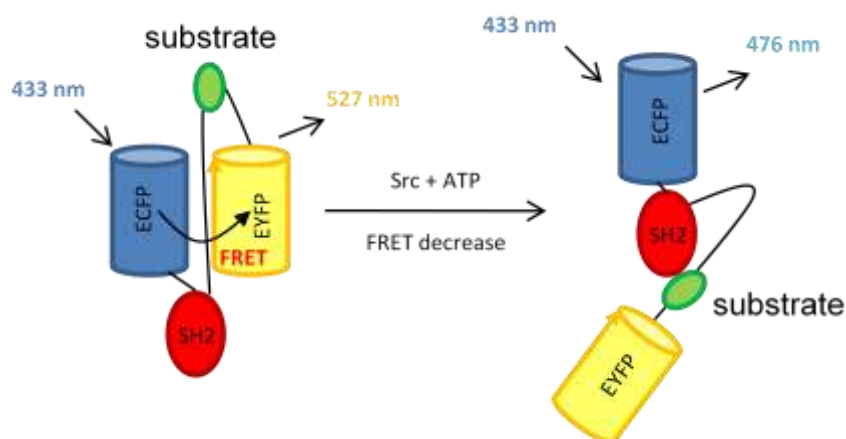
Tra i diversi fluorocromi geneticamente sintetizzati, CFP (cyan fluorescence protein) and YFP (yellow fluorescence protein) sono la coppia donatore/accettore più usata per FRET analisi (Tsien, 1998). Sono stati generati con successo molti biosensori basati su CFP e YFP al fine di monitorare l'attività di varie chinasi in vivo (Sato et al., 2002; Ting et al., 2001; Zhang et al., 2001).

## Biosensori FRET per la valutazione dell'attività delle Src-chinasi

La tecnologia FRET consente la visualizzazione dell'attività di Src in vivo con un'alta risoluzione spazio-temporale. Un primo biosensore FRET per lo studio dell'attività di Src è stato inizialmente sviluppato nel laboratorio di Roger Tsien (Ting et al., 2001). Questo originale Src reporter contiene all'N-terminale ECFP (tECFP, 1-227) (Miyawaki et al., 1997), un dominio SH2 derivato da Src chinasi, un linker flessibile (GSTSGSGKPGSGEGS) (Ting et al., 2001), una sequenza substrato (EIYGEF), selezionata in seguito a *peptide library screening* per essere specificamente fosforilata da Src (Songyang et al., 1995), e al C-terminale EYFP (una versione migliorata di YFP) (Figura 2).

Il meccanismo di attivazione molecolare di questo Src reporter è ipotizzato come segue: quando la Src-chinasi è al suo stato inattivo (rest state) ECFP e EYFP sono posizionati in prossimità come conseguenza della flessibilità del linker e della giustapposizione di N- e C-terminali del dominio SH2. Pertanto, l'eccitazione di tECFP a 433 nm, porta all'emissione di EYFP a 527 nm. Quando Src chinasi è attiva fosforila il peptide substrato, che acquisisce quindi un elevato grado di affinità per il dominio SH2. Il peptide fosforilato si lega quindi al dominio SH2. Questo comporta la separazione di EYFP da ECFP, e quindi la diminuzione dell'efficienza di FRET tra i due fluorocromi. L'eccitazione di ECFP a 433 nm porta all'emissione a 476 nm (Figura 2)

Pertanto, il rapporto di emissione ECFP / EYFP dovrebbe servire come un buon indicatore dello stato di attivazione Src.

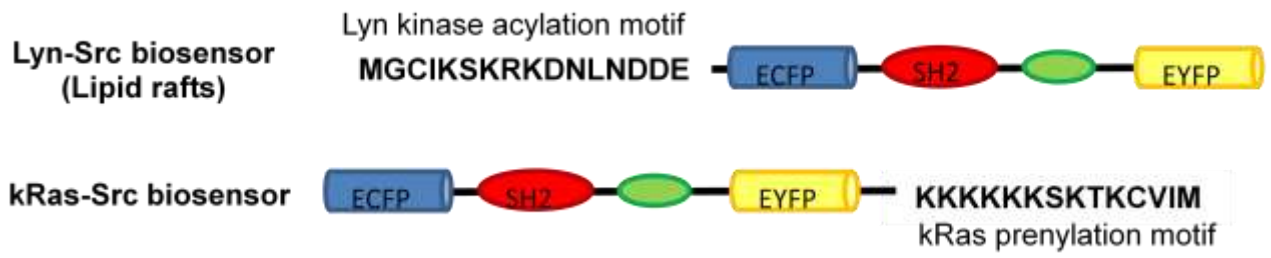


**Figura 2.** Lo schema illustra il cambiamento nel segnale FRET dopo l'attivazione di Src.

I membri della famiglia delle Src chinasi (SFKs) svolgono ruoli importanti in numerosi processi cellulari (Martin., 2001). Recenti evidenze indicano che la traslocazione di Src alla membrana plasmatica è un prerequisito fondamentale per la sua attivazione (Sandilands et al., 2004); i diversi membri di questa famiglia traslocano in compartimenti distinti della membrana (Sandilands et al., 2007). Ad esempio, Lyn e Fyn, traslocano nei compartimenti ricchi di colesterolo (lipid rafts) (Toomre e Simons, 2000), attraverso le loro sequenze all’N-terminale di meristolazione e palmitolazione (Zacharias et al., 2002). Src chinasi ha solo il dominio di meristolazione. Risultati controversi attribuiscono a Src differenti localizzazioni a livello della membrana plasmatica (Arcaro et al., 2007; Hitosugi et al., 2007; Hur et al., 2004; Kasai et al., 2005; Mukherjee et al., 2003; Shima et al., 2003), fatto che può essere attribuito ai diversi effetti dei detergenti non ionici detergenti utilizzati in questi studi, per isolare i lipid rafts (Lichtenberg et al., 2005; Shaw, 2006).

Per monitorare l’attività di Src nei diversi compartimenti di membrana, il gruppo di Wang (Wang et al, 2005) ha modificato il biosensore FRET fondendolo con sequenze che permettevano la localizzazione dello stesso nei lipid rafts o al di fuori di questi. Il biosensore Lyn-Src biosensor è stato generato aggiungendo all’N-terminale le sequenze substrato di acilazione derivate dalla chinasi Lyn. La guanina e la cisteina della sequenza substrato di acilazione possono venire palmitolate e miristilate (Resh, 1994), indirizzando il biosensore nei lipid rafts (Simons and Toomre, 2000). Il biosensore che risiede all’esterno di questi domini ricchi in colesterolo (KRas-Src biosensor) è stato sviluppato introducendo la sequenza di prenilazione (KKKKKSKTKCVIM) derivate da KRas al suo C-terminale. Un gruppo farnesile può essere aggiunto a questa sequenza di prenilazione indirizzando così il sensore alla membrana plasmatica al di fuori dei lipid rafts (Zacharias et al, 2002) (Figura 3).





**Figura 3. Rappresentazione schematica dei biosensori FRET.** Questi sono costituiti da ECFP, dominio SH2, linker, substrato di Src e EYFP. Il Lyn-Src biosensore contiene la sequenza substrato dell'acilazione derivata da Lyn all'N-terminale. Il Kras-Src biosensore è stato sviluppato introducendo al C-terminale la sequenza di prenilazione derivata da KRas.

## **SCOPO DELLO STUDIO**

I diversi compartimenti della membrana plasmatica fungono da piattaforme di segnalazione per la trasduzione di segnali, tra cui quello mediato dai membri della famiglia delle Src chinasi. Tuttavia, non è chiaro come l'attività di Src sia regolata nei diversi compartimenti della membrana plasmatica. Il gruppo di Wang e colleghi (Università dell'Illinois) ha in passato messo a punto un biosensore Src basato sulla FRET. Questo biosensore è stato ulteriormente modificato per essere indirizzato nei diversi compartimenti della membrana plasmatica ed ha permesso di quantificare l'attivazione locale di Src, in vivo, su cellule stimolate con pervanadato, un inibitore delle fosfatasi. Questo gruppo ha dimostrato che nelle cellule HeLa, l'attivazione di Src nei lipid rafts è più lenta e ritardata rispetto all'attivazione al di fuori dei raft lipidici. Il trasporto di Src dalla regione perinucleare ai lipid rafts è risultato essere actina-mediato. Al contrario il trasporto di Src al di fuori dei rafts è mediato dai microtubuli. Questi dati suggeriscono che vi sono due distinte popolazioni di Src chinasi, che vengono attivate sulla membrana plasmatica attraverso meccanismi diversi.

Ma cosa succede durante l'attivazione dei linfociti T?

Nell'ambito del filone di ricerca volto a sviluppare nuovi strumenti per la visualizzazione della trasduzione di segnale nei linfociti T in vivo, abbiamo voluto valutare, mediante l'utilizzo di questi biosensori (gentilmente concessi da Wang e colleghi) l'attivazione delle Src chinasi, in particolare Lck, in seguito ad attivazione delle cellule T, nei lipid rafts (in particolare nelle sinapsi immunologiche) ed in altri compartimenti di membrana.

## **MATERIALI E METODI**

### **Costrutti**

I costrutti Lyn e KRas-Src biosensor ci sono stati gentilmente forniti dal gruppo di Wang e colleghi. In breve, il gene per il biosensore è stato costruito mediante amplificazione per PCR del DNA complementare per il dominio SH2 di c-Src, con un primer senso contenente il sito di restrizione per SphI e con un primer antisenso contenente la sequenza genica per la porzione del linker, per il substrato e con un sito di restrizione per SacI. I prodotti di PCR sono stati fusi a ECFP all'N-terminale e a EYFP al C-terminale. I costrutti sono poi stati clonati in pcDNA 3.1 usando HindIII/NotI per l'espressione in cellule di mammifero. Al fine di trasdurre cellule T primarie di topo, i costrutti sono stati trasferiti nel vettore retrovirale pMX.

### **Topi**

I topi 5C.C7 transgenici per il TCR (5C.C7 TCRtg RAG-2<sup>-/-</sup> H-2a) sono stati ottenuti da Taconic Farms. I topi B10.BR (B10.BR-H2k H2-T18a/SgSnJ) sono stati acquistati presso Jackson Laboratories.

### **Purificazione cellule T**

Per la purificazione dei linfociti T splenici, gli splenociti sono stati deprivati delle cellule CD8+, MHC-II positive, e immunoglobuline positive mediante selezione negativa anticorpo-mediata (EasySep CD4+ negative selection cocktail, StemCell Technologies). Le cellule CD4+ sono state poi stimulate con splenociti B10.BR irradiati e peptide MCC (moth cytochrome C peptide 88-103) per 6 giorni.

## **Transfezione e Trasduzione retrovirale**

30 µg di DNA codificante per i biosensori per l'attivazione di Src (Lyn-Src e KRas-Src) sono stati trasfettati nella linea ecotropica PlatE mediante Lipofectamine Reagent (Invitrogen). Le cellule T CD4+ derivate dai topi 5C.C7 sono state stimolate con gli splenociti irradiati derivati dai topi B10.BR e con 10µM di peptide MCC. Dopo 18 e 42 ore dalla stimolazione, le cellule T sono state incubate per 6h con il surnatante virale, prodotto dalle platE precedentemente trasfettate, addizionato a lipofectamina, e centrifugate a 1800 rpm per 40 minuti. Il quinto giorno dopo la stimolazione, le cellule T YFP positive sono state sortate mediante FACSVantage flow sorter e poi utilizzate per i differenti esperimenti.

## **Lisi cellulare e Western Blot**

Le cellule T, trasdotte con i biosensori Src, sono state stimolate con un egual numero di cellule CH27 (presentanti l'antigene), caricate o no con 30µM di peptide MCC. A tempi diversi le cellule sono state raccolte e lisate in ghiaccio per 20 minuti in lysis buffer (25 mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl, 5 mM EDTA più inibitori delle proteasi) contenente l'1% di TritonX-100 e centrifugate per 15 minuti a 14000 rpm. Il surnatante così ottenuto rappresenta l'estratto proteico che viene dosato mediante l'uso di Protein Assay (Biorad), una variante del metodo Braedford.

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

I campioni sono stati quindi trasferiti su filtro di nitrocellulosa (Biorad) per 1 ora 100V in tampone di trasferimento (Tris base 3g/l, Glicina 14,4 g/l, SDS 1 g/l, Metanolo 10%). La nitrocellulosa viene quindi saturata con una soluzione di 5% latte in polvere sciolto in TBS-T, e incubata 2 ore a temperatura ambiente 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.

### **Immunofluorescenza CD69**

Le cellule T, trasdotte con i biosensori Src, sono state stimulate con un egual numero di cellule CH27 (presentanti l'antigene), caricate o no con 30 $\mu$ M di peptide MCC. Dopo 4h le cellule sono state raccolte, fissate in paraformaldeide 4% e incubate prima con anti CD69-biotina coniugato e poi, dopo 2 lavaggi in PBS, con Streptavidina-cy5 coniugata. Le cellule sono poi state analizzate al citofluorimetro per l'espressione in membrana del marker di attivazione CD69.

### **Formazione delle sinapsi immunologiche**

I linfociti T CD4<sup>+</sup> (5C.C7), trasdotti con i diversi costrutti, sono stati stimolati con un egual numero di cellule CH27 (presentanti l'antigene), caricate o no con 30 $\mu$ M di peptide MCC. A tempi diversi le cellule sono state raccolte, fissate, montate su vetrini precedentemente trattati con Poli-L-lisina (Sigma) e analizzate al microscopio confocale. Circa 100 coniugati linfociti T-CH27 sono stati analizzati per il reclutamento o meno dei due biosensori nella zona di contatto (sinapsi immunologica). Le immagini sono state ottenute utilizzando un set di filtri di emissione per CFP e YFP, in seguito ad eccitazione di CFP (450nm) e il modulo di acquisizione multidimensionale del software MetaMorph.

### **Esperimenti di Time Lapse Imaging**

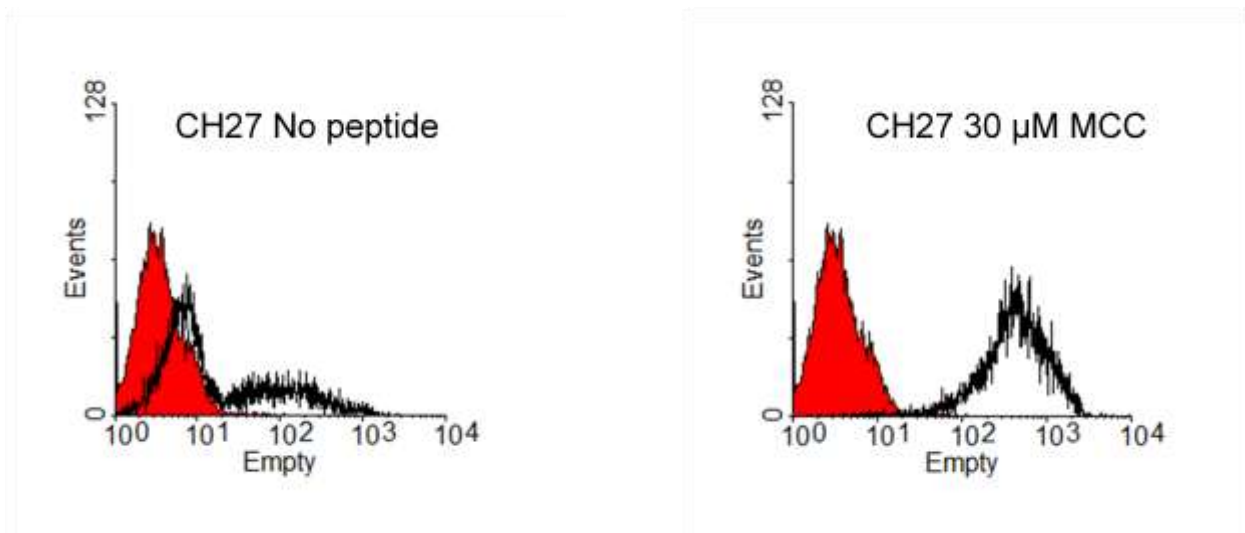
Le cellule CH27, caricate o no con 30 $\mu$ M di peptide MCC sono state poste in terreno HBSS (Hanks' balanced salt solution) con 20mM di HEPES (pH 7,4) in una camera termostatica a 37°C. I linfociti T CD4<sup>+</sup> (5C.C7), trasdotti con i diversi costrutti, sono stati aggiunti ad esse. In questo modo è stato possibile monitorare la formazione dei coniugati linfocita T-CH27 nel tempo e la successiva attivazione di Lck (Src) analizzando la variazione del segnale FRET.

Le immagini sono state acquisite utilizzando un set di filtri di emissione per CFP e YFP, in seguito ad eccitazione di CFP (450nm) e il modulo di acquisizione multidimensionale del software MetaMorph.

## RISULTATI

### **Attivazione delle cellule 5C.C7 trasdotte con i biosensori FRET**

Le cellule T CD4+, trasdotte con i biosensori Src, sono state stimulate con un egual numero di cellule CH27 (presentanti l'antigene), caricate o no con 30 $\mu$ M di peptide MCC. Dopo 4h le cellule sono state raccolte e analizzate al citofluorimetro per l'espressione in membrana di CD69. Come si può vedere in Figura 4, le cellule coltivate con CH27 caricate con il peptide esprimono in membrana alti livelli di CD69, marker precoce di attivazione delle cellule T. Questo risultato dimostra che il nostro sistema di stimolazione dei linfociti T 5C.C7 funziona e induce attivazione degli stessi.

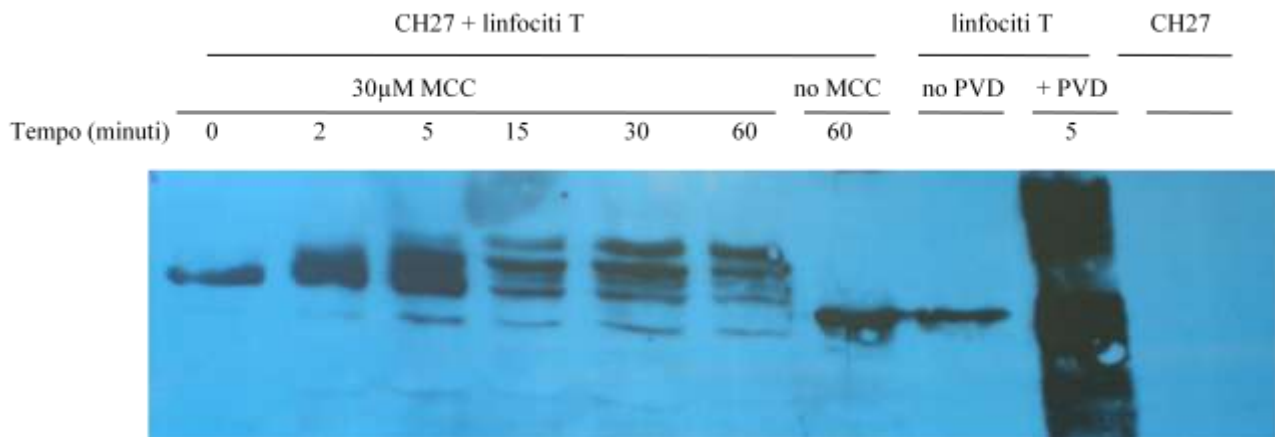


**Figura 4. Analisi dell'espressione di CD69 in cellule T CD4+ (5C.C7).** Le cellule sono state co-coltivate con ugual numero di CH27 caricate o no con 30 $\mu$ M di peptide MCC per 4h. Le cellule sono state raccolte, fissate in paraformaldeide 4% e incubate prima con anti CD69-biotina coniugato e poi con Streptavidina-cy5 coniugata e analizzate al citofluorimetro per l'espressione in membrana di CD69.

### **Cinetica di attivazione dei linfociti T stimolati con CH27 e peptide MCC**

Un altro indicatore dell'attivazione dei linfociti T in seguito a stimolazione del TCR è la fosforilazione delle proteine a valle nella trasduzione del segnale, tra cui la chinasi Lck. Le cellule T (5C.C7) trasdotte sono state stimulate con le cellule presentanti l'antigene CH27, caricate o no con

peptide MCC. A tempi diversi di stimolazione le cellule sono state raccolte, e i loro lisati analizzati mediante Western Blot per la fosforilazione delle proteine. Come atteso la co-coltura con CH27 senza peptide non induce fosforilazione. Si ha invece attivazione dei linfociti T dopo solo due minuti di stimolazione. Il trattamento con 10 $\mu$ M di pervanadato, inibitore delle fosfatasi, induce una forte fosforilazione proteica (Figura 5).



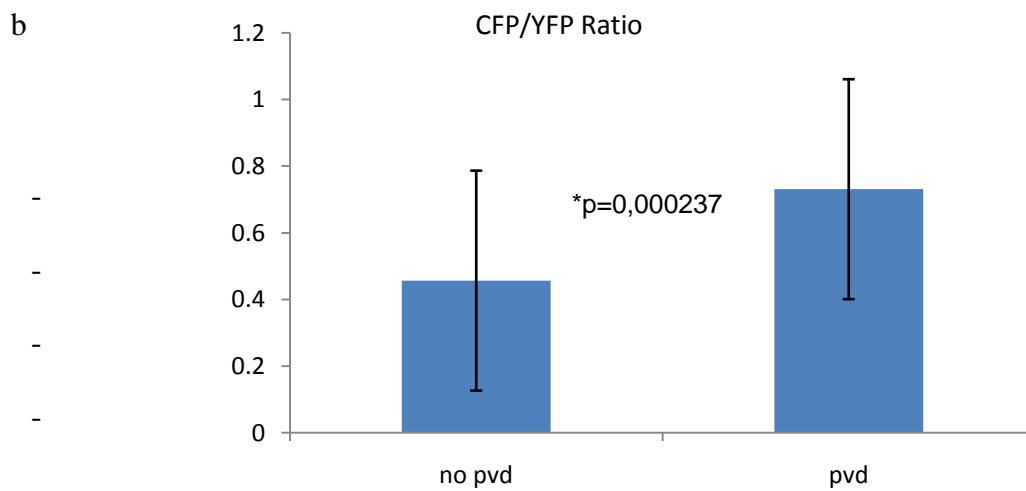
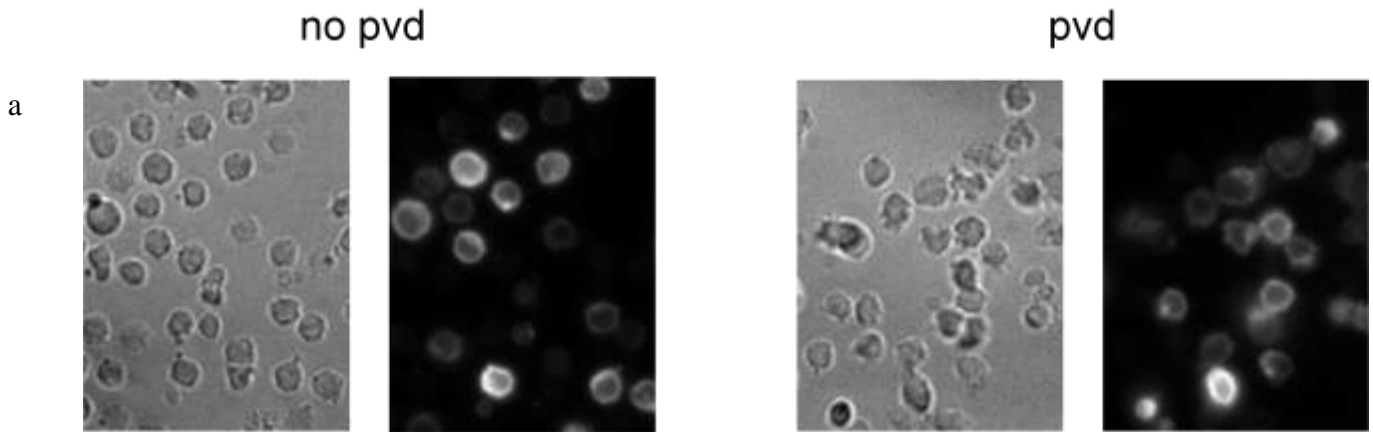
**Figura 5. Western Blot analisi della cinetica di attivazione delle cellule T 5C.C7 dopo stimolazione con MCC.** Linfociti T CD4+ (5C.C7) sono stati stimolati con CH27 caricate con 30 $\mu$ M di peptide MCC per i tempi indicati. Dopo stimolazione, le cellule sono state lisate e analizzate in Western Blot per la fosforilazione in tirosina delle proteine, utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-pTyr (clone 4G10, Upstate Biotechnology). PVD=pervanadato.

### Analisi dell'attivazione di Src (Lck) mediante l'utilizzo di Lyn-Src e Kras-Src biosensor

- *Valutazione del cambiamento del segnale FRET dopo stimolazione con Pervanadato*

Un noto sistema di attivazione delle chinasi è la stimolazione delle cellule mediante pervanadato, un potente inibitore delle fosfatasi. Al fine di valutare se questi biosensori potessero risultare utili per studiare l'attivazione di Src in cellule T, abbiamo stimolato i linfociti T CD4+ trasdotti con i Src biosensor, con 10 $\mu$ M di Pervanadato per 5 minuti e valutato il cambiamento nel segnale FRET. Come si può vedere dalla figura 6, lo stimolo induce un incremento del rapporto di emissione CFP/YFP, indice dell'attivazione delle chinasi.



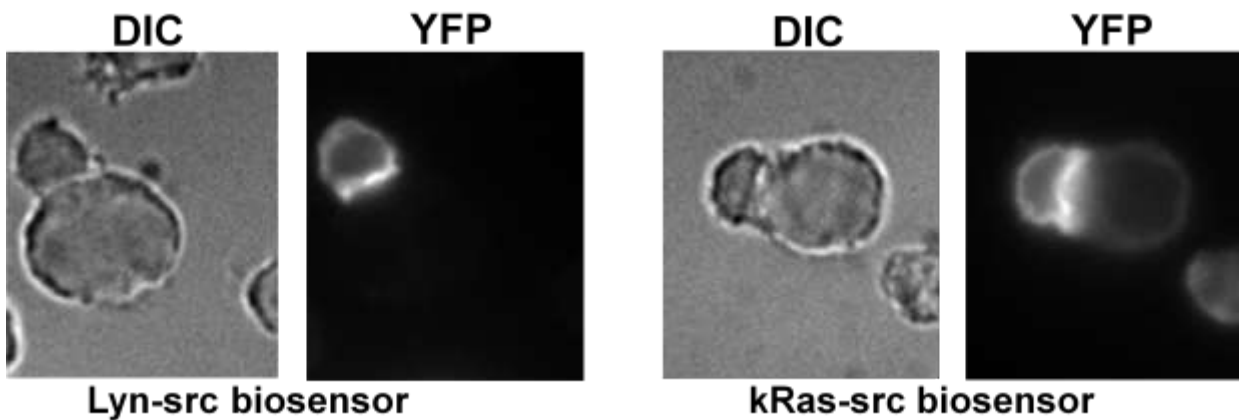


**Figura 6. Attivazione di Src chinasi dopo stimolo con Pervanadato.** a) immagini al microscopio di cellule T trasdotte con Src biosensor prima e dopo stimolo con PVD fissate su vetrini e poi analizzate per il cambiamento del segnale FRET. b) quantificazione del rapporto di emissione CFP/YFP. \* T test

- *Formazione delle sinapsi immunologiche*

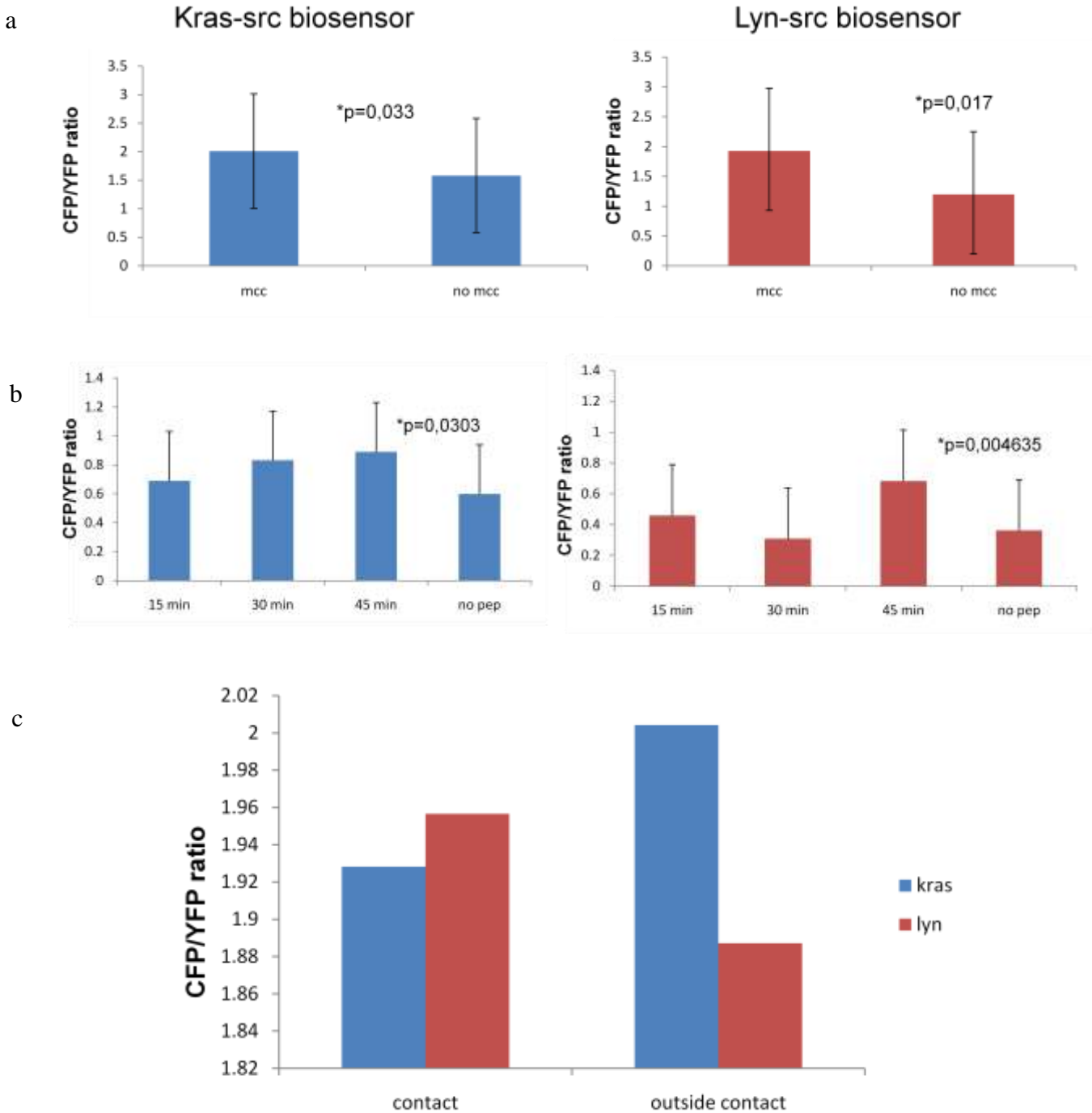
Le cellule T (5C.C7) trasdotte con i due biosensori (Lyn e Kras-Src biosensor), sono state incubate con CH27 e peptide MCC. Dopo 15, 30, 60 minuti le cellule sono state fissate su vetrino polilisinato e analizzate al microscopio confocale. Entrambi i costrutti vengono reclutati nella zona di contatto linfocita T-APC. E' noto che lipid rafts rappresentano una piattaforma per la trasduzione del segnale TCR-mediato: il fatto che il biosensore Lyn-Src con la sequenza segnale per i rafts venga reclutato nella sinapsi immunologica non

sorprende. Non ci sono però evidenze in letteratura che descrivano un reclutamento di KRas (Figura 7)



**Figura 7.** Immagini al microscopio confocale dei coniugati linfocita T-CH27. DIC=luce trasmessa

Le immagini sono state ottenute utilizzando un set di filtri di emissione per CFP e YFP, in seguito ad eccitazione di CFP (450nm) e il modulo di acquisizione multidimensionale del software MetaMorph. Questo permette di ottenere contemporaneamente immagini con emissione di CFP, YFP e, nel canale FRET, emissione di YFP in seguito ad eccitazione di CFP. Per ogni immagine ho quindi calcolato il cambiamento di segnale FRET come rapporto tra emissione CFP/eccitazione CFP emissione YFP. Per entrambi i costrutti vi è un cambiamento di segnale FRET significativo quando i linfociti T sono stimolati con CH27 caricate con peptide MCC (Figura 8a) rispetto a quando sono co-coltivati con CH27 senza peptide. Seguendo nel tempo l'attivazione di Src valutando la variazione del segnale FRET in queste cellule, si può notare come nei linfociti T trasdotti con Lyn-Src biosensor, il rapporto di emissione CFP/YFP aumenti già a partire da 15 minuti di co-coltura con le cellule CH27 caricate con MCC (Figura 8b). La Src chinasi associata invece a porzioni di membrana esterne ai lipid rafts sembra attivarsi solo dopo 45 minuti di stimolazione.



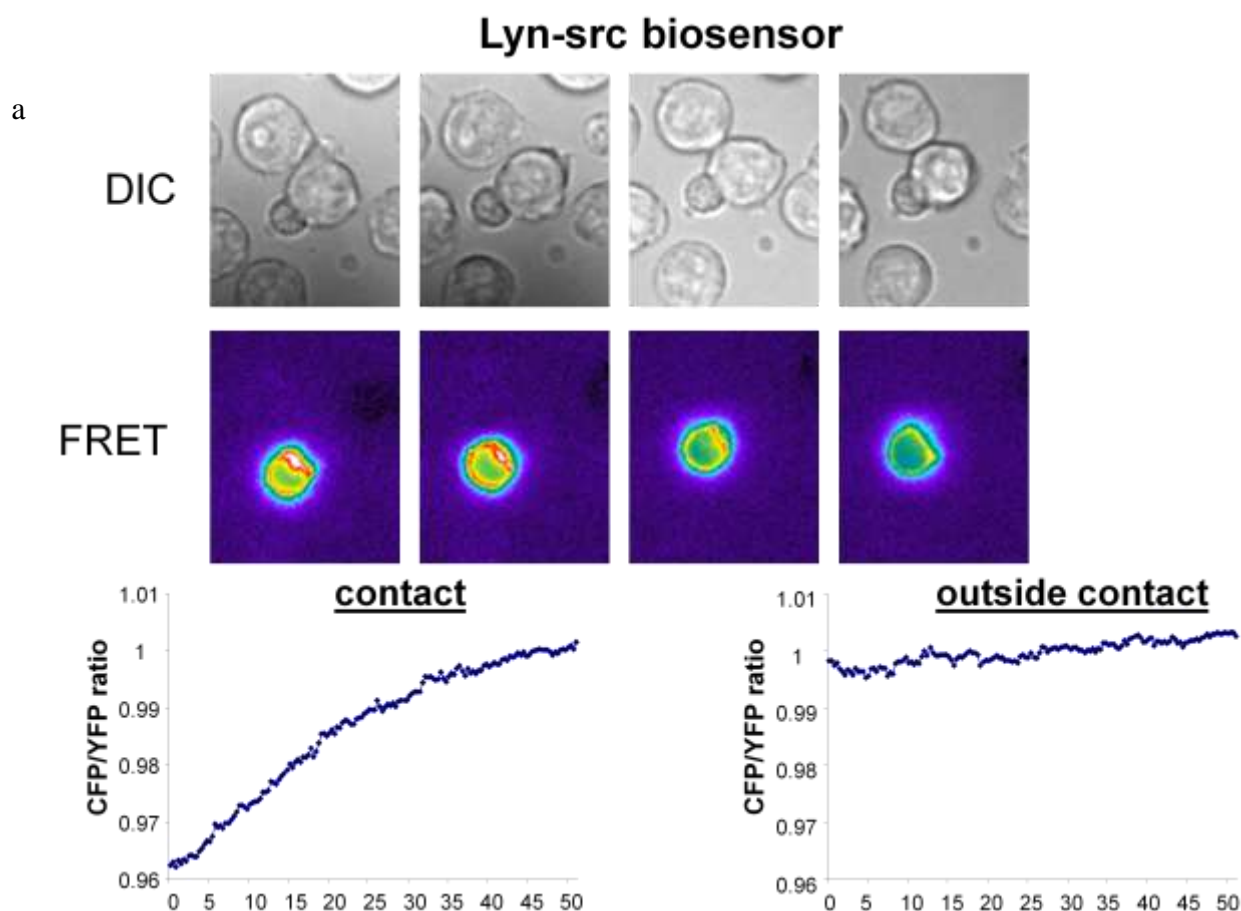
**Figura 8. Analisi dell'attivazione di Src.** Linfociti T CD4+ (5C.C7) sono stati stimolati con CH27 caricate con 30 $\mu$ M di peptide MCC per i tempi indicati. Dopo stimolazione, le cellule sono state fissate su vetrino polilisinato e analizzate al microscopio confocale con MetaMorph. \* T test

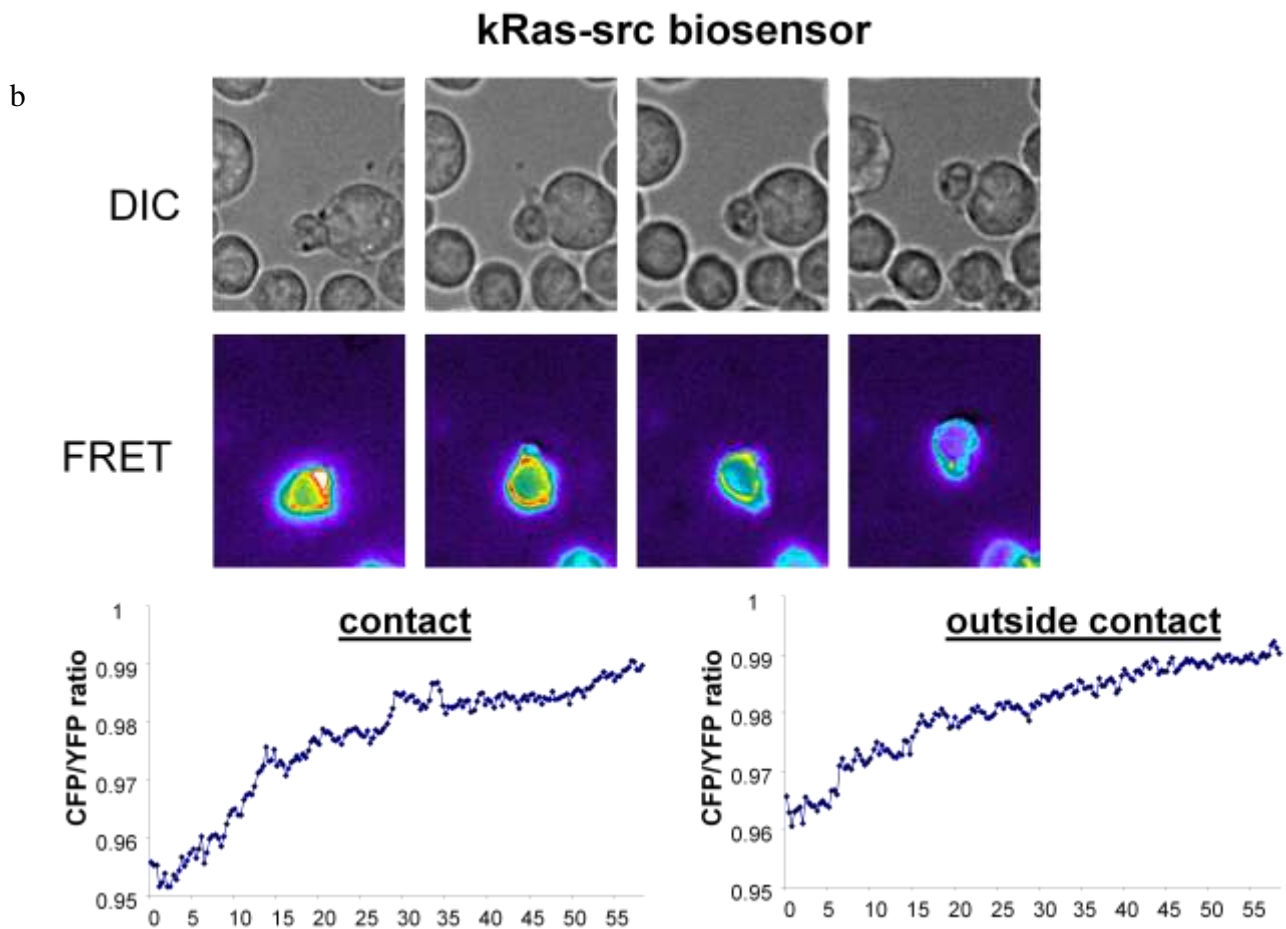
Ho inoltre valutato lo stesso rapporto tra emissione CFP/YFP nella zona di contatto linfocita T-CH27 rispetto alla restante parte di membrana plasmatica. I risultati mostrano come nella zona di contatto ci sia più attivazione di Src associata ai lipid rafts. Al contrario, al di fuori

della sinapsi immunologica si ha attivazione di Src non associata a questi particolari compartimenti. Questo sembra confermare che i lipid rafts funzionino effettivamente come piattaforma per la trasduzione del segnale TCR-mediato.

- *Esperimenti di Time Lapse Imaging*

Le cellule CH27, caricate o no con 30 $\mu$ M di peptide MCC sono state poste in terreno in una camera termostatica a 37°C. I linfociti T CD4+ (5C.C7), trasdotti con i diversi costrutti, sono stati aggiunti ad esse per valutare in vivo la formazione di coniugati e la risposta dei due costrutti all'attivazione. Come si può vedere dalla figura 8, il cambiamento nel rapporto tra emissione CFP/emissione YFP è più marcato nella zona di contatto nei linfociti trasdotti con il biosensore Lyn-Src, a conferma dei dati precedenti (Figura 9a). Quando i linfociti sono invece trasdotti con il biosensore KRas-Src il cambiamento di segnale FRET è visibile sia nella zona di contatto sia al di fuori di essa (Figura 9b).





**Figura 9. Esperimenti di time-lapse imaging.** Alle cellule CH27, caricate o no con 30 $\mu$ M di peptide MCC sono stati aggiunti i linfociti T CD4<sup>+</sup> (5C.C7), trasdotti con i due diversi costrutti. E' stata poi monitorata formazione dei coniugati linfocita T-CH27 nel tempo e la successiva attivazione di Lck (Src) analizzando la variazione del segnale FRET. Le immagini sono state acquisite utilizzando il set di filtri di emissione per CFP e YFP, in seguito ad eccitazione di CFP (450nm) e il modulo di acquisizione multidimensionale del software MetaMorph.

## **DISCUSSIONE**

I linfociti T svolgono un ruolo centrale nella risposta immunitaria, sia come cellule effettrici sia come cellule regolatorie in grado di modulare le funzioni di numerosi altri tipi cellulari. L'evento principale che porta all'attivazione e alla differenziazione dei linfociti T maturi è il legame tra il loro recettore antigene-specifico (TCR) con il ligando specifico, che consiste in un peptide processato e presentato, in associazione con molecole MHC, dalle cellule presentanti l'antigene (APC). Questo evento porta all'attivazione di numerosi pathways di trasduzione del segnale che coinvolgono secondi messaggeri, protein-chinasi, fosfatasi e altri enzimi e mediatori chiave (Mustelin et al., 1990; June et al., 1990; Altman et al., 1990; Klausner et al., 1991). Questa cascata di segnalazione culmina con l'induzione della trascrizione di geni specifici e con la successiva differenziazione e proliferazione di queste cellule. Tra le chinasi coinvolte nel signaling TCR-mediato, un ruolo chiave è svolto da alcuni membri della famiglia delle Src chinasi, in particolare Lck. Recenti evidenze indicano che la traslocazione di Src alla membrana plasmatica sia un prerequisito fondamentale per la sua attivazione (Sandilands et al., 2004); i diversi membri di questa famiglia traslocano in compartimenti distinti della membrana (Sandilands et al., 2007). Ad esempio, Lyn e Fyn, traslocano nei compartimenti ricchi di colesterolo (lipid rafts).

Un metodo per visualizzare l'attivazione delle Src chinasi è l'utilizzo di biosensori basati su FRET (fluorescence resonance energy transfer), che permettono di monitorare i vari eventi cellulari in cellule vitali con un'alta risoluzione spazio temporale. Il gruppo di Wang ha creato questi Src biosensori (Lyn e KRas-Src biosensor) in grado di essere indirizzati in diversi compartimenti della membrana plasmatica dopo attivazione delle chinasi, rispettivamente nei lipid rafts e al di fuori di questi.

In contrasto con i tradizionali test in vitro effettuati in provette e cuvette, l'integrazione tra FRET e biosensori specifici per diversi domini di membrana, consente la quantificazione dei parametri cinetici di reazioni enzimatiche in compartimenti della membrana plasmatica, la cui dimensione può

essere inferiore a quello della risoluzione del convenzionale microscopio ottico a fluorescenza (ad esempio, la dimensione del singolo lipid raft è di circa 50 nm) (Pralle et al, 2000). Pertanto, questi test, insieme ai saggi tradizionali, possono essere utili per migliorare la visualizzazione delle reazioni enzimatiche in vivo.

Numerosi gruppi hanno cercato di visualizzare in vivo ed in vitro cosa accade nei primi stadi dell'attivazione dei linfociti T dopo stimolazione TCR- mediata. Nell'ambito di questo filone di ricerca abbiamo voluto vedere se questi biosensori potessero essere utili per monitorare gli eventi, in particolare la fosforilazione Src mediata, a valle del signaling del TCR.

I risultati del gruppo di Wang su cellule HeLa, hanno portato all'individuazione di due distinte popolazioni di Src, attivate sulla membrana plasmatica attraverso meccanismi diversi; l'attivazione di Src nei lipid rafts è più lenta e ritardata rispetto all'attivazione al di fuori dei raft lipidici. Il trasporto di Src dalla regione perinucleare ai lipid rafts è risultato essere actina-mediato. Al contrario il trasporto di Src al di fuori dei rafts è mediato dai microtubuli.

Dal momento che i lipid rafts giocano un ruolo fondamentale nei linfociti T nel trafficking di membrana e nella trasduzione di segnale. TCR- mediato (via Lck) (Harder and Simons, 1999; Janes et al., 1999; Pizzo and Viola, 2003), ci siamo chiesti se anche in questa popolazione cellulare potessero esistere due distinte popolazioni di Src chinasi e quali fossero eventualmente le loro cinetiche di attivazione.

I nostri risultati dimostrano che entrambi i costrutti vengono reclutati dopo stimolazione nella sinapsi immunologica linfocita T-APC, ma l'attivazione di Src, visualizzata mediante cambiamento del segnale FRET, avviene probabilmente più velocemente nei lipid rafts: infatti solo dopo 15 minuti di stimolazione si ha un significativo incremento del rapporto emissione CFP/emissione YFP dopo formazione dei coniugati linfocita T trasdotto con Lyn-Src biosensor e CH27. Questo incremento è visibile nelle cellule T trasdotte con KRas-Src biosensor solo dopo 45 minuti di co-coltura con le cellule APC. Gli esperimenti di time-corse inoltre mostrano che questo repentino

cambiamento di segnale FRET è più visibile nella zona di contatto linfocita T-APC quando viene utilizzato il biosensore Lyn-Src, a dimostrazione del fatto che la trasduzione del segnale TCR-mediata inizia nei lipid rafts, come già descritto in letteratura (Harder and Simons, 1999; Janes et al., 1999; Pizzo and Viola, 2003). Quando i linfociti sono invece trasdotti con il biosensore KRas-Src il cambiamento di segnale FRET è visibile sia nella zona di contatto sia al di fuori di essa. Questi dati preliminari sembrano quindi identificare due distinte popolazione di Src, una che si attiva nella zona di contatto linfocita T-APC in seguito a stimolazione del TCR e una al di fuori della sinapsi immunologica.

Questi biosensori inoltre sembrano essere uno strumento utile per studiare in vivo i primi eventi di attivazione dei linfociti T in seguito a stimolazione del loro recettore TCR.

**Questo lavoro è stato svolto presso il laboratorio di immunologia diretto dal Prof. Andrey Shaw, Pathology and Immunology Department, Washington University in St. Louis, Missouri, USA.**



## **BIBLIOGRAFIA**

- Altman A, Coggeshall KM, Mustelin T. Molecular events mediating T cell activation. *Adv Immunol.* 1990;48:227–360.
  
- Arcaro A, Aubert M, Espinosa del Hierro ME, Khanzada UK, Angelidou S, Tetley TD, Bittermann AG, Frame MC, Seckl MJ. Critical role for lipid raft-associated Src kinases in activation of PI3K-Akt signalling. *Cell Signal* 2007 19: 1081-1092.
  
- Chan AC, Dalton M, Johnson R, Kong GH, Wang T, Thoma R, Kurosaki T. Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* 1995 Jun 1;14(11):2499–2508.
  
- Couture C, Baier G, Oetken C, Williams S, Telford D, Marie-Cardine A, Baier-Bitterlich G, Fischer S, Burn P, Altman A, et al. Activation of p56lck by p72syk through physical association and N-terminal tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1994 Aug;14(8):5249–5258.
  
- Duplay P., Thome M., Hervè F and Acuto O. p56lck interacts via its src homology 2 domain with the ZAP-70 kinase. *J Exp Med.* 1994 Apr 1;179(4):1163–1172.
  
- Furukawa T, Itoh M, Krueger NX, Streuli M, Saito H. Specific interaction of the CD45 protein-tyrosine phosphatase with tyrosine-phosphorylated CD3 zeta chain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 8;91(23):10928–10932.
  
- Harder T, Simons K. Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation. *Eur J Immunol.* 1999 Feb;29(2):556-62.
  
- Hitosugi T, Sato M, Sasaki K, Umezawa Y. Lipid raft specific knockdown of SRC family kinase activity inhibits cell adhesion and cell cycle progression of breast cancer cells. *Cancer Res* 2007, 67: 8139-8148.
  
- Hope HR, Pike LJ. Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell.* 1996 Jun;7(6):843-51.

- Hur EM, Park YS, Lee BD, Jang IH, Kim HS, Kim TD, Suh PG, Ryu SH, Kim KT. Sensitization of epidermal growth factor-induced signaling by bradykinin is mediated by c-Src. Implications for a role of lipid microdomains. *J Biol Chem* 2004, 279: 5852-5860.
- Janes PW, Ley SC, Magee AI. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol.* 1999 Oct 18;147(2):447-61.
- June CH, Fletcher MC, Ledbetter JA, Schieven GL, Siegel JN, Phillips AF, Samelson LE. Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 87(19):7722–7726.
- Kasai A, Shima T, Okada M. Role of Src family tyrosine kinases in the down-regulation of epidermal growth factor signaling in PC12 cells. *Genes Cells* 2005, 10: 1175-1187.
- Katzav S, Sutherland M, Packham G, Yi T, Weiss A. The protein tyrosine kinase ZAP-70 can associate with the SH2 domain of proto-Vav. *J Biol Chem.* 1994 Dec 23;269(51): 32579–32585.
- Klausner RD, Samelson LE. T cell antigen receptor activation pathways: the tyrosine kinase connection. *Cell.* 1991 Mar 8;64(5):875–878.
- La Face DM, Couture C, Anderson K, Shih G, Alexander J, Sette A, Mustelin T, Altman A, Grey HM. Differential T cell signaling induced by antagonist peptide-MHC complexes and the associated phenotypic responses. *J Immunol.* 1997 Mar 1;158(5):2057–2064.
- Lichtenberg D, Goni FM, Heerklotz H. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci* 2005, 30: 430-436.
- Liu, Karen-Qianye.;Bunnell, Stephen C.;Gurniak, Christine B.; Berg, Leslie J. T Cell Receptor–initiated Calcium Release Is Uncoupled from Capacitative Calcium Entry in Itk-deficient T Cells . *J Exp Med.* 1998 May 18;187(10):1721–1727.
- Madrenas J, Wange RL, Wang JL, Isakov N, Samelson LE, Germain RN. Zeta phosphorylation without ZAP-70 activation induced by TCR antagonists or partial agonists. *Science.* 1995 Jan 27;267(5197):515–518.
- Martin GS. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2: 467-475.

- Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R and Tsien RY. Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96,2135–2140.
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M and Tsien RY. Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 1997, 388, 882–887.
- Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A and Matsuda M. Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 2001, 411, 1065–1068.
- Montixi C, Langlet C, Bernard AM, Thimonier J, Dubois C, Wurbel MA, Chauvin JP, Pierres M, He HT. Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J.* 1998 Sep 15;17(18):5334-48.
- Mukherjee A, Arnaud L, Cooper JA. Lipid-dependent recruitment of neuronal Src to lipid rafts in the brain. *J Biol Chem* 2003, 278: 40806-40814.
- Mustelin T, Coggeshall KM, Isakov N, Altman A. T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. *Science.* 1990;247(4950):1584–1587.
- Mustelin T, Taskén K. Positive and negative regulation of T-cell activation through kinases and phosphatases. *Biochem. J.* 2003;371:15-27.
- Neumeister EN, Zhu Y, Richard S, Terhorst C, Chan AC, Shaw AS. Binding of ZAP-70 to phosphorylated T-cell receptor zeta and eta enhances its autophosphorylation and generates specific binding sites for SH2 domain-containing proteins. *Mol Cell Biol.* 1995 Jun;15(6):3171–3178.
- Ohtani YY, Zhou XY, Toyooka K, Tai XG, Park CS, Hamaoka T, Abe R, Miyake K, Fujiwara H Non CD28 costimulatory molecules present in T-cell rafts induce T-cell costimulation by enhancing the association of TCR with rafts. *J. Immunol.* 2000 164, 1251.
- Perez-Villar JJ, Kanner SB. Regulated association between the tyrosine kinase Emt/Itk/Tsk and phospholipase-C gamma 1 in human T lymphocytes. *J Immunol.* 1999 Dec 15;163(12):6435–6441.

- Persechini A and Cronk B. The relationship between the free concentrations of Ca<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-calmodulin in intact cells. *J. Biol. Chem.* 1999, 274, 6827–6830.
- Pizzo P, Viola A. Lymphocyte lipid rafts: structure and function. *Curr Opin Immunol.* 2003 Jun;15(3):255-60
- Pralle A, Keller P, Florin EL, Simons K, Horber JK. Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J Cell Biol* 2000, 148: 997-1008
- Resh MD. Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 1994, 76: 411-413.
- Sandilands E, Brunton VG, Frame MC. The membrane targeting and spatial activation of Src, Yes and Fyn is influenced by palmitoylation and distinct RhoB/RhoD endosome requirements. *J Cell Sci* 2007, 120: 2555-2564.
- Sandilands E, Cans C, Fincham VJ, Brunton VG, Mellor H, Prendergast GC, Norman JC, Superti-Furga G, Frame MC. RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane. *Dev Cell* 2004, 7: 855-869.
- Sato, M., Ozawa, T., Inukai, K., Asano, T., and Umezawa, Y. (2002). Fluorescent indicators for imaging protein phosphorylation in single living cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 287–294.
- Shaw AS. Lipid rafts: now you see them, now you don't. *Nat Immunol* 2006, 7: 1139-1142.
- Shima T, Nada S, Okada M. Transmembrane phosphoprotein Cbp senses cell adhesion signaling mediated by Src family kinase in lipid rafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100: 14897-14902.
- Shimomura O, Johnson FH and Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan *Aequorea*. *J. Cell Comp. Physiol.* 1962, 59, 223–239.
- Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997 Jun 5;387(6633):569-72.
- Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000, 1: 31-39.

- Sloan-Lancaster J, Shaw AS, Rothbard JB, Allen PM. Partial T cell signaling: altered phospho-zeta and lack of zap70 recruitment in APL-induced T cell anergy. *Cell*. 1994 Dec 2;79(5):913–922.
- Songyang Z, Carraway KL, Eck MJ, Harrison SC, Feldman RA, Mohammadi M, Schlessinger J, Hubbard SR, Smith DP, Eng C, Lorenzo MJ, Ponder BAJ, Mayer, BJ, and Cantley LC. Catalytic specificity of protein-tyrosine kinases is critical for selective signalling. *Nature* 1995, 373, 536–539.
- Ting AY, Kain KH, Klemke RL and Tsien RY. Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 15003–15008.
- Tour O, Meijer RM, Zacharias DA, Adams SR, and Tsien RY. Genetically targeted chromophore-assisted light inactivation. *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 1505–1508.
- Truong K, Sawano A, Mizuno H, Hama H, Tong KI, Mal TK, Miyawaki A, and Ikura M. FRET-based in vivo Ca<sup>2+</sup> imaging by a new calmodulin-GFP fusion molecule. *Nat. Struct. Biol.* 2001, 8, 1069–1073.
- Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem* 1998, 67, 509–544.
- Violin JD, Zhang J, Tsien RY and Newton AC. A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation by protein kinase C. *J. Cell Biol.* 161, 2003, 899–909.
- Wange RL, Guitián R, Isakov N, Watts JD, Aebersold R, Samelson LE. Activating and inhibitory mutations in adjacent tyrosines in the kinase domain of ZAP-70. *J Biol Chem.* 1995 Aug 11;270(32):18730–18733.
- Wang Y, Botvinick EL, Zhao Y, Berns MW, Usami S, Tsien RY, Chien S. Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* 2005, 434: 1040-1045.
- Wang Y, Chien S. Analysis of integrin signaling by fluorescence resonance energy transfer. *Methods Enzymol.* 2007;426:177-201.
- Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 2002, 296: 913-916.
- Zhang J, Campbell RE, Ting AY, and Tsien RY. Creating new fluorescent probes for cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2002, 3, 906–918.

- Zhang J, Ma Y, Taylor SS and Tsien, RY. Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 14997–15002.
- Zhang W, Tribble RP, Samelson LE. LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation. *Immunity*. 1998 Aug;9(2):239-46.

## SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

### I ANNO

**18 Novembre 2005.** Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits. Dott. Diego Cotella.

**23 Novembre 2005.** HCV-related steatosis: pathogenic mechanism and clinical implications. Prof. Luigi Elio Adinolfi.

**25 novembre 2005.** Mechanism of transcriptional regulation and disease. Prof. Robert Tjian.

**19 Gennaio 2006.** Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation. Prof.ssa Maria Grano.

**13 Febbraio 2006.** New perspectives in metabotropic glutamate receptors. Prof. Ferdinando Nicoletti.

**15 Febbraio 2006.** Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico. Prof. Daniele Sblattero.

**13 Marzo 2006.** Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell'emofilia. Dott.ssa Atonia Follenzi.

**20 Marzo 2006.** The natural course of preclinical type 1 diabetes. Prof. Mikael Knip.

**6 Aprile 2006.** Aspetti immunogenetici e terapeutici della "hairy cell leukemia". Dott. Francesco Forconi.

**20 Aprile 2006.** Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative. Dott.ssa Daniela Cilloni.

**4 maggio 2006.** Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale. Dott. Luciano Mutti.

**18 Maggio 2006.** L'epatite autoimmune. Prof. Marco Lenzi.

**30 Maggio 2006.** Sperm mediated gene transfer: storia e applicazioni. Prof.ssa Marialuisa Lavitrano.

**15 Giugno 2006.** Melusin: a stretch sensor molecule controlling adaptive cardiac remodeling to pressure overload. Prof. Guido Tarone.

**27 Giugno 2006.** Osteointegrazione e superfici implantari. Prof.ssa Lia Rimondini.

**5 luglio 2006.** DNA and protein arrays in infectious diseases: from basic research to vaccine design. Dott.ssa Renata Grifantini.

**11 settembre 2006.** The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis. Prof. Dieter Bromm.

## II ANNO

- 10 gennaio 2007.** Gene silencing by RNA interference (RNAi). Prof.ssa P. DeFilippi
- 17 gennaio 2007.** Detection of miRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3'-UTR regions. Prof. M. Caselle
- 18 gennaio 2007.** Patogenesi del Diabete Mellito di tipo 1: stiamo vincendo o stiamo perdendo? Prof. GF Bottazzo
- 1 febbraio 2007.** Gene therapy strategies for Phenylketonuria. Prof. B. Thöny
- 9 febbraio 2007.** Vita morte e miracoli dell'epatocita. Prof. M Tripodi
- 22 febbraio 2007.** Fragile X-syndrome from RNA metabolism impairment to spine dysmorphogenesis. Prof. C. Bagni
- 14 marzo 2007.** Protein microarrays development of new supports for improved sensisivity. Dr. M. Cretich
- 15 marzo 2007.** Colangiopatie autoimmuni. Prof. M. Podda
- 16 marzo 2007.** Microarrays di tessuti: una strategia per identificare nuovi biomarcatori tumorali. Dott.ssa M. Capra
- 29 marzo 2007.** Marcatori farmacogenetici nel carcinoma coloretale: quali prospettive per una terapia personalizzata? Prof. E. Mini
- 12 aprile 2007.** Relazione tra struttura e funzione delle proteine mediante analisi del protein database. Prof. Milanesio
- 16 maggio 2007.** Difetti genetici del pre-B cell receptor. Prof. Ferrari
- 25 maggio 2007**The regulation of hematopoietic stem cellsby SMAD signaling. Dott. Karlsson
- 28 maggio 2007.** Translating basic science into therapeutic strategies for Shwachmann Diamond Syndrome. Dott. Ellis
- 4 giugno 2007.** Sindromi autoinfiammatorie. Prof. A Martini
- 21 giugno 2007.** Bioinformatics tools for the analysis of UTRs and for the prediction of alternative splice site. Prof. E Mignone



### III ANNO

#### (seminari dipartimento di Patologia e Immunologia, Washington University in St. Louis, MO, USA)

**11 febbraio 2008.** Marco Colonna, M.D. Washington University School of Medicine Department of Pathology & Immunology

**18 febbraio 2008.** Georgio Trinchieri, M.D. Center for Cancer Research - National Cancer Institute Toll-like Receptors, Inflammation, and Cancer

**25 febbraio 2008.** Jonathan Green, M.D. Washington University School of Medicine Department of Medicine – Pulmonary and Critical Care

**3 marzo 2008.** Casey Weaver, M.D. University of Alabama – Birmingham School of Medicine. The Th17 lineage; development, function and fate

**10 marzo 2008.** KC Choi, Ph.D. Washington University School of Medicine Department of Pathology & Immunology. Pathways in Blood and Vessel Development

**17 marzo 2008.** Vishva Dixit, M.D. Genetech, Inc.

**24 marzo 2008.** Wayne Yokoyama, M.D. Washington University School of Medicine Department of Medicine – Rheumatology. Something new, something old about NK cells and innate immunity

**31 marzo 2008.** André Veillette, M.D. Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

**14 aprile 2008.** Abul Abbas, M.D. University of California – San Francisco

**21 aprile 2008.** Robyn Klein, M.D., Ph.D. Washington University School of Medicine Department of Medicine – Infectious Diseases

**28 aprile 2008.** **Lacy Lecture** Robert Weinberg, Ph.D. Whitehead Institute. Mechanisms of Malignant Progression

**5 maggio 2008.** Steve Reiner, M.D. University of Pennsylvania School of Medicine

**12 maggio 2008.** Jeff Gordon, M.D. Washington University School of Medicine Department of Molecular Biology & Pharmacology

**22 settembre 2008.** Eugene Oltz, Ph.D., Vanderbilt University Medical School - Genetic and Epigenetic Control of Antigen Receptor Gene Assembly

**29 settembre 2008.** Herbert Virgin, M.D., Ph.D., WUSM, Pathology and Immunology - Stealth Additions to our Metagenome: Persistent Viruses and Their Effects on the Host

## **CORSI FREQUENTATI**

**I ANNO:** corso di Inglese tenuto dal Prof. Irving Bell

## **CONGRESSI FREQUENTATI**

- XXVIII Congresso Nazionale della Società italiana di Patologia, Università degli studi di Pavia, 19-22 settembre 2006.
- XIV Telethon Convention, Palazzo dei Congressi, Salsomaggiore Terme, 12-14 Marzo, 2007.
- European Bioalpine Convention, Colletterto Giacosa. 6-7 Novembre, 2007.
- IRC Meeting, Cambridge, MA, USA, 29 Luglio, 2008

## **COMUNICAZIONI A CONGRESSI**

**“Variazioni nel gene di perforina in pazienti con sclerosi multipla”**. Orilieri E., Cappellano G., Comi C., Chiocchetti A., Cerutti E., Castelli L., Monaco F., Dianzani U. (XXVIII Congresso Nazionale della Società italiana di Patologia, Università degli studi di Pavia, 19-22 settembre 2006). (POSTER)

**“Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function”**. Cappellano G., Chiocchetti A., Cerutti E., Ferretti M., Orilieri E., Dianzani I., Ramenghi U., Dianzani U. (16<sup>th</sup> European Congress of Immunology; PARIS, 6-9-September 2006) (POSTER).

**“Variazioni nel gene di perforina nei pazienti con autoimmunità/linfoproliferazione e difettiva funzionalità di Fas”**. Cerutti E., Cappellano G., Chiocchetti A., Clementi R., Ferretti M., Orilieri E., Dianzani I., Ferrarini M., Bregni M., Danesino C., Bozzi V., Putti M.C., Cometa A., Locatelli F., Maccario R., Ramenghi U., Dianzani U. (XXVIII Congresso Nazionale della Società italiana di Patologia, Università degli studi di Pavia, 19-22 settembre 2006). (COMUNICAZIONE ORALE)

**“Search for genetic alterations of the Fas system in the autoimmune/lymphoproliferative syndrome (ALPS)”**. Dianzani U., Chiocchetti A., Cappellano G., Orilieri E., Cerutti E., Ferretti M., Clementi R., Notarangelo L., Ramenghi U. (XIV Telethon Convention, Palazzo dei Congressi, Salsomaggiore Terme, 12-14 Marzo, 2007). (POSTER).

**“Co-inherited mutations of Fas and caspase-10 in development of the autoimmune lymphoproliferative syndrome.”** Cerutti E, Campagnoli MF, Ferretti M, Garelli E, Crescenzo N, Rosolen A, Chiochetti A, Lenardo MJ, Ramenghi U, Dianzani U. (European Bioalpine Convention, Collettero Giacosa. 6-7 Novembre, 2007) (POSTER)

**“Developing tools for studying T cell activation.”** Cemerski S, Cerutti E, Zinselmeyer B, Miller M, Wang Y and Shaw A. (IRC Meeting, Cambridge, MA, USA, 29 Luglio, 2008) (POSTER)

## PUBBLICAZIONI

Clementi R, Chiochetti 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* 108(9):3079-84, 2006.

Castelli L, Comi C, Chiochetti A, Nicola S, Mesturini R, Giordano M, D'Alfonso S, Cerutti E, Galimberti D, Fenoglio C, Tesser F, Yagi J, Rojo JM, Perla F, Leone M, Scarpini E, Monaco F, Dianzani U. **ICOS gene haplotypes correlate with IL10 secretion and multiple sclerosis evolution.** *J Neuroimmunol.* 186(1-2):193-8, 2007.

Cerutti E, Campagnoli MF, Ferretti M, Garelli E, Crescenzo N, Rosolen A, Chiochetti A, Lenardo MJ, Ramenghi U, Dianzani U. **Co-inherited mutations of Fas and caspase-10 in development of the autoimmune lymphoproliferative syndrome.** *BMC Immunol.* 2007 Nov 13;8:28.

Orilieri E, Cappellano G, Clementi R, Cometa A, Ferretti M, Cerutti E, Cadario F, Martinetti M, Larizza D, Calcaterra V, D'Annunzio G, Lorini R, Cerutti F, Bruno G, Chiochetti A, Dianzani U. **Variations of the perforin gene in patients with type 1 diabetes.** *Diabetes.* 2008 Apr;57(4):1078-83.