

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



**Dottorato di Ricerca  
in  
Medicina Molecolare**

*Ciclo XXIV*

**Sistema lentivirale per la trasduzione di linee cellulari  
e caratterizzazione di una mutazione in caspasi-9  
nella proliferazione cellulare.**

**RESPONSABILE**

Prof. Dianzani Umberto

**CANDIDATO**

Melensi Matteo

## ***INDICE***

<b>Introduzione</b>	Pag 3
<b>Materiali e Metodi</b>	Pag 24
<b>Risultati</b>	Pag 30
<b>Discussione</b>	Pag 42
<b>Prospettive future</b>	Pag 44
<b>Bibliografia</b>	Pag 48

# INTRODUZIONE

## Apoptosi

L'apoptosi detta "morte cellulare programmata" riveste un ruolo critico nella regolazione dell'equilibrio del sistema immunitario.

I progenitori dei linfociti B e T maturano rispettivamente nel midollo osseo e nel timo; durante questa fase il riarrangiamento dei geni genera un grande numero di recettori (Ig per i linfociti B e TCR per i linfociti T) che non sono in grado di riconoscere molecole MHC self (complesso maggiore di istocompatibilità) o sono potenzialmente autoreattivi.

Il repertorio di linfociti che esprimono un recettore appropriato è ottenuto con un processo di selezione clonale che porta alla morte per apoptosi dei linfociti con alta affinità per gli antigeni self. Nel timo, organo linfatico primario per i linfociti T, questo processo di selezione è caratterizzato dal meccanismo di riconoscimento dell'antigene proprio dei linfociti T. Questi infatti riconoscono l'antigene processato e presentato dalle molecole MHC delle cellule presentanti l'antigene (APC, antigen presenting cells) [1]. Pertanto, nel corso della maturazione timica occorre eliminare i timociti potenzialmente autoreattivi e consentire la maturazione dei timociti ristretti per le molecole MHC self. La prima fase della selezione timica, selezione positiva, consente la sopravvivenza di tutti i timociti che possono legare molecola MHC self, eliminando i linfociti T incapaci di riconoscere queste molecole. Durante la seconda fase, selezione negativa, (simile a quello che si verifica nel midollo osseo per i linfociti B) avviene l'eliminazione per apoptosi dei timociti con TCR specifico per peptidi self associati alle molecole MHC self [2].

Tuttavia, la delezione dei cloni linfocitari autoreattivi non interessa tutti i cloni autoreattivi poiché non tutti gli antigeni self sono rappresentati nel midollo osseo e nel timo. L'immissione in periferia di questi linfociti T non porta necessariamente allo sviluppo di malattie autoimmuni in quanto queste cellule possono ancora essere controllate da meccanismi di tolleranza periferica.

L'attivazione del linfocita richiede due segnali distinti: -un primo segnale generato dall'antigene presentato su MHC e -un secondo segnale proveniente da molecole costimolatorie che interagiscono con i loro rispettivi ligandi presenti sulle cellule APC.

Il riconoscimento dell'antigene in assenza del secondo segnale, conduce ad uno stato di quiescenza (anergia) o apoptosi del linfocita. In questo modo, l'attivazione dei linfociti avviene soltanto in un contesto infiammatorio durante il quale le APC esprimono molecole costimolatorie riducendo il rischio di aggressioni contro il self.

L'apoptosi svolge un ruolo importante anche nella citotossicità cellulo-mediata. I linfociti citotossici, infatti, si legano al bersaglio e lo uccidono innescando la morte cellulare attraverso vari meccanismi:

- liberazione di perforina e granzimi, la prima polimerizza sulla membrana del bersaglio producendo dei pori in cui passano i granzimi in grado di attivare varie caspasi;
- espressione di FasL che lega il recettore Fas espresso dalla cellula bersaglio;
- produzione di  $TNF\alpha$  e/o linfotossina che legano i rispettivi recettori innescando la morte cellulare.

Il processo apoptotico, inoltre, è fondamentale nello spegnimento della risposta immunitaria al fine di mantenere l'omeostasi numerica dei linfociti. Nel caso dei linfociti, esistono due meccanismi di controllo. Il primo meccanismo (sistema passivo) conduce alla morte dei linfociti che hanno risposto all'antigene. L'esaurimento dell'antigene determina una riduzione della secrezione di citochine importanti per la sopravvivenza cellulare e dell'espressione dei loro recettori da parte dei linfociti. Il calo degli stimoli di sopravvivenza causa una diminuzione dei livelli cellulari delle molecole antiapoptotiche e il conseguente innesco della via apoptotica intrinseca (ACAD, activation cell-autonomous death) [3-4].

Il secondo meccanismo, invece, elimina i linfociti alcuni giorni dopo la loro attivazione. Questa morte è favorita da una riattivazione del linfocita da parte dell'antigene (AICD, activation-induced cell death) ed è legata all'azione di alcuni recettori appartenenti alla famiglia del TNF-receptor (TNFR) nella via estrinseca dell'apoptosi [3-4].

### **Le vie dell'apoptosi**

Nel sistema immunitario, un'ampia varietà di stimoli possono attivare tre differenti vie di morte cellulare.

- La "via estrinseca" stimolata dall'interazione ligando-recettore che conduce alla formazione di un complesso in grado di attivare la cascata delle caspasi.
- La "via intrinseca" stimolata da condizioni di stress cellulare (mancanza di fattori di crescita, raggi UV, stimolazione con etoposide) che porta alla formazione di un complesso detto apoptosoma.
- La "via di salvataggio" (autofagia) meccanismo per il mantenimento dell'omeostasi cellulare che in alcune circostanze può condurre alla morte cellulare.

Nella via estrinseca, i recettori (death receptor) appartenenti alla famiglia dei recettori del fattore di necrosi tumorale (TNF-R: TNF-R1, TNF-R2, Fas/CD95, DR3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR6)

interagiscono con i rispettivi ligandi extracellulari (appartenenti alla famiglia del TNF [5-6]) e inducono il pathway apoptotico. Un esempio è il ligando extracellulare (FasL) che interagisce e induce trimerizzazione del recettore transmembrana Fas/CD95/Apo1 conducendo al reclutamento di una molecola citosolica adattatrice FADD (Fas-Associated Death Domain) e della procaspasi-8 che formano, in questo modo, un complesso detto DISC (Death-Inducing Signaling Complex) [7].

FAS e FADD interagiscono con i loro domini DD (death domain) mentre FADD e caspasi-8 interagiscono attraverso un dominio DED (death-effector domain).

L'attivazione di caspasi-8, mediante taglio proteolitico, innesca una cascata attivatoria che coinvolge la caspasi-10 e le caspasi -3,-7,-6 che, nella loro forma attiva, sono in grado di agire su specifici substrati. La caspasi-3 attiva il substrato CAD (deossiribonucleasi-caspasi-dipendente) che, traslocando nel nucleo, inizia a degradare il DNA in frammenti di 180 bp [8]. Altri bersagli, invece, sono distrutti in seguito all'azione delle caspasi: le proteine della matrice nucleare (lamina) responsabili della coartazione nucleare, proteine citoscheletriche (actina, citocheratina) responsabili della forma cellulare, fattori trascrizionali (GATA-1, STAT-1), chinasi (Akt, Raf-1, MEK), enzima per il riparo del DNA (PARP-1) [6-8].

Caspasi-8, inoltre, è legata alla via intrinseca apoptotica (generalmente indotta da stress e attivata da caspasi-9) attraverso due meccanismi diversi: la scissione proteolitica della molecola Bid e la sintesi di ceramide indotta dall'attivazione di sfingomielinasi acide/neutre [9].

Il frammento di Bid e ceramide, traslocando sulla membrana esterna del mitocondrio, interagiscono con BAX (BCL-2 associated protein X) e BAK (BCL-2 antagonist/killer) permettendo a quest'ultimi di oligomerizzare. Questo stimola il rilascio di citocromo-c nel citoplasma che, legandosi ad Apaf-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1) e procaspasi-9, porta alla formazione di un complesso noto come apoptosoma [10].

Comunque, in condizioni di stress moderato (carenza di fattori trofici) le cellule ricorrono a risorse alternative per mantenere la sopravvivenza cellulare (autofagia); le cellule sequestrano proteine e organelli invecchiati per riciclarne le diverse parti e assicurarsi la sintesi di enzimi e componenti necessari alla sopravvivenza. L'autofagia è anche il processo di degradazione più importante per l'eliminazione di componenti citoplasmatici e organuli danneggiati e non più funzionanti che potrebbero essere causa di alterato funzionamento della cellula.

La prima fase del processo autofagico prevede la formazione di vescicole citoplasmatiche (autofagosomi) contenenti porzioni di citoplasma e/o organelli citoplasmatici. La degradazione avviene con la fusione dell'autofagosoma con un lisosoma che permette alle idrolasi del sistema lisosomico di degradare il contenuto delle vescicole.

Tuttavia, una prolungata condizione di stress o un mancato controllo della regolazione dell'autofagia possono condurre alla "morte cellulare autofagica"-indipendente dalle caspasi. Questa mostra peculiarità morfologiche simili all'apoptosi e sembra essere un passaggio indispensabile per l'inizio del processo apoptotico in quanto si è osservato che inibitori dell'autofagia eliminano l'apoptosi mentre inibitori delle caspasi non inibiscono l'autofagia [11].

### **L'apoptosoma**

L'attivazione di caspasi-9 richiede il cofattore Apaf-1, proteina di circa 130 KDa, il quale esiste in una forma monomerica in assenza di uno stimolo apoptotico.

Apaf-1 è una proteina costituita da tre regioni funzionali: - un dominio CARD (Caspase-recruitment domain) responsabile per il reclutamento e interazione con caspasi-9; -una regione NB-ARC, composta da tre domini, responsabile del legame per ATP; - una sequenza WD40, organizzata in due domini con ripetizioni di quaranta amminoacidi, responsabile per il legame con il citocromo-c. In assenza di stimoli, queste regioni del cofattore Apaf-1 adottano una struttura compatta che non permette la formazione dell'apoptosoma [10-12].

Successivamente ad un segnale apoptotico, l'aumento della concentrazione citosolica di citocromo-c permette il reclutamento di Apaf-1; il legame del citocromo-c alle ripetizioni WD40 di Apaf-1 conduce il cofattore ad una conformazione semi-aperta ma ancora inibita. In questa struttura autoinibita, il dominio CARD interagisce con il dominio ATPase presente sulla regione NB-ARC. Questa interazione ha due importanti conseguenze: impedire il reclutamento di caspasi-9 con il dominio CARD e bloccare il dominio ATPase impedendo l'abilità di Apaf-1 di formare oligomeri. In seguito, il cambiamento conformazionale di Apaf-1 determina l'idrolisi del nucleotide dATP in dADP; tale modificazione consente ad Apaf-1 di oligomerizzare formando una struttura eptamerica ad anello (apoptosoma) in grado di reclutare procaspasi-9 attraverso i domini CARD [10-12].

### **Le Caspasi**

Le caspasi sono una famiglia di cistein-proteasi in grado di idrolizzare i loro substrati in corrispondenza di residui di acido aspartico (Asp-X-X-Asp), svolgendo un ruolo fondamentale in diversi aspetti dell'apoptosi. Alcune caspasi possono idrolizzare il precursore di citochine al fine di attivarli (caspasi 1 e 11), altre innescano la propagazione dei segnali apoptotici (caspasi-8, 9 e 10), altre realizzano il programma apoptotico mediante scissione diretta di diverse proteine vitali per la cellula e mediante l'attivazione di processi trascrizionali all'interno del nucleo (caspasi-3, 6 e 7) [13]. Le caspasi vengono sintetizzate come fattori zimogeni inattivi (procaspasi) composti da tre

principali subunità (un pro-domain e due porzioni catalitiche). Nei fattori zimogeni queste catene bloccano la formazione del sito attivo. Una volta attivate, le caspasi assumono una forma eterotetrameriche che permette la corretta disposizione del residuo catalitico e del sito per il substrato e sono in grado di processare e attivare altre procaspasi determinando una cascata di attivazione sequenziale.

Le caspasi vengono suddivise, in base alla loro specificità di substrato, in due gruppi: caspasi iniziatrici (caspasi -8,-9,-10) che agiscono nelle prime fasi dell'apoptosi e caspasi esecutrici (caspasi -3,-6,-7) responsabili della fase effettrice del processo apoptotico [13].

Ciò nonostante, le caspasi sono coinvolte in diversi processi cellulari non-apoptotici come la regolazione del ciclo e differenziamento cellulare e nella proliferazione [7-14-15-16].

Nel differenziamento, le caspasi-3,-8 regolano i processi di formazione degli eritrociti, delle piastrine e il differenziamento dei monociti [8]. Le caspasi sono attivate in risposta a specifici fattori di crescita; l'azione di queste proteasi su proteine target conduce all'attivazione di fattori trascrizionali coinvolti nella regolazione di specifici geni [17].

Alcuni studi, condotti su pazienti con deficienza nell'espressione di caspasi-8, hanno evidenziato un'associazione di tale deficit con un difetto nel controllo dell'attivazione-proliferazione dei linfociti T, B e delle cellule NK; fattori trascrizionali (NF-kB, NFAT), attivati dall'azione catalitica delle caspasi, regolano l'espressione di molecole di superficie (CD25) e la produzione di citochine (IL-2) [18-19]. L'inibizione delle caspasi può, quindi, portare alla riduzione del rilascio di IL-2 e dell'espressione di CD25 sviluppando immunodeficienze [15-18].

Il difetto nell'attivazione dei linfociti T, B e NK suggerisce un'azione comune della caspasi-8 nel pathway di trasduzione del segnale attivatorio dei linfociti [18]. Alti livelli di caspasi attivate conducono all'apoptosi; limitati livelli di caspasi, invece, conducono ad una funzione non apoptotica suggerendo la possibilità di una attivazione indipendente dall'induzione di una cascata apoptotica [15-20].

Nella regolazione del ciclo cellulare dei linfociti B, invece, è stata dimostrata la capacità della caspasi-3 di agire su differenti inibitori del ciclo cellulare ( $Wee1$ ,  $p21^{Waf1}$ ,  $p27^{KIP1}$ ) che, sottoposti all'azione delle proteasi, non sono in grado di inattivare le chinasi regolatorie (Cdc) favorendo la progressione dei linfociti B nelle fasi del ciclo cellulare [15-16-20-21].

Un altro modello ipotizza il coinvolgimento di FADD e caspasi-8 nel controllo della progressione del ciclo cellulare. Durante la mitosi, FADD (fosforilato sulla serina194 nella fase G2/M) associa con caspasi-8 o con altre proteine mitotiche (MDP, mitotic DISC-forming protein) formando un



complesso in grado di portare alla maturazione di proteine coinvolte nella progressione del ciclo cellulare [22].

Le caspasi dimostrano di essere checkpoints addizionali per il controllo del ciclo cellulare.

Le funzioni non-apoptotiche delle caspasi implicano che le cellule possono restringere l'attività proteolitica delle proteasi su specifici substrati.

La de-regolazione dei differenti pathways può essere indicata come la causa del quadro fisiopatologico di molte malattie umane. Rimane da chiarire come l'attività proteolitica delle caspasi su specifici substrati possa essere ristretta all'interno delle cellule. Una possibilità consiste nella compartimentalizzazione delle caspasi, l'esistenza di proteine scaffold e nella regolazione dell'attività delle caspasi da parte di fattori anti-apoptotici che permettono l'attivazione in distinti compartimenti cellulari o una minore attività durante il differenziamento [23].

### **Caspasi-9**

Il gruppo delle caspasi iniziatrici comprende la caspasi-9 che, come tutte le caspasi, appartiene alla famiglia delle cistein-proteasi ed è sintetizzata sottoforma di pro-enzima inattivo.

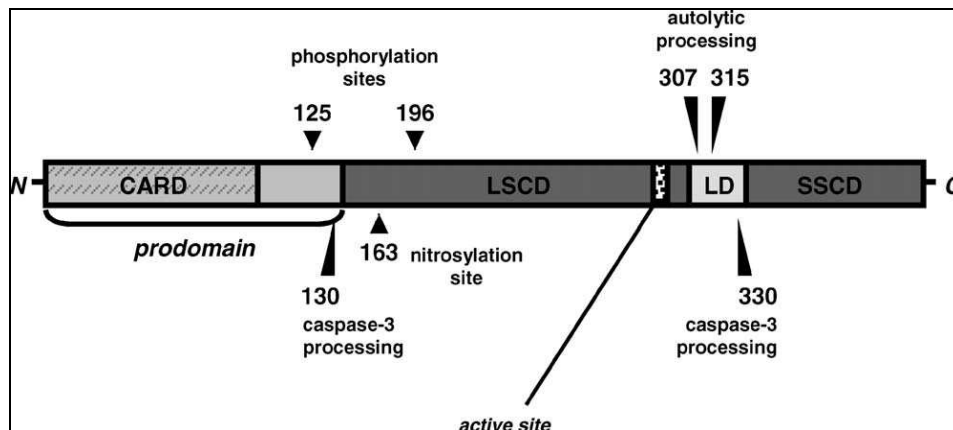
Il gene presente sul tratto cromosomico 1p36.1-1p36.3 è lungo 35 kb ed è costituito da 9 esoni e 8 introni [24].

La forma inattiva (procaspasi-9) è formata da tre subunità principali [25]:

- PRO-DOMAIN contenente il dominio CARD (Caspase-Recruitment Domain) essenziale per il legame con Apaf-1
- LSCD (Large Subunit Catalytic Domain) che costituisce, nella forma attiva, la subunità p35 ( $G^{140}PEPD^{315}$ ) con il sito attivo (pentapeptide  $Q^{285}ACGG^{288}$ ) che presenta i loops L1 e L2
- SSCD (Small Subunit Catalytic Domain) che costituisce, nella forma attiva, la subunità p10 ( $A^{331}S^{416}$ ) contenente i loops L3 e L4

La pro-caspasi-9 può essere sottoposta, ad opera della caspasi-3 o di altre caspasi-9, a due tagli proteolitici a livello dei residui aminoacidici 130 e 330 [25]. Si presenta come un eterotetramero costituito dalle subunità p10 e p35 unite da un linker di 15 aminoacidi ( $A^{316}D^{330}$ ) [26].

In figura 1-2 viene rappresentata la struttura tridimensionale e il diagramma della procaspasi-9 che mostra i residui aminoacidici sottoposti a tagli proteolitici e modificazioni post-traduzionali (fosforilazione e nitrosilazione) [25-26].

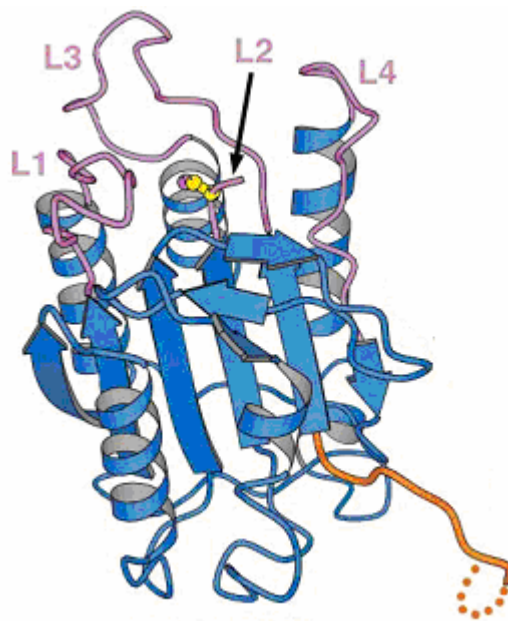


**Figura 1**

**Diagramma pro-caspasi-9 umana**

Il diagramma mostra le tre principali subunità della pro-caspasi-9: Pro-domain contenente il dominio CARD, Large Subunit Catalytic Domain (LSCD) e la Small Subunit Catalytic Domain (SSCD). E' mostrato il dominio linker tra le due subunità (LD).

Le frecce indicano i residui aminoacidici interessati a tagli proteolitici e i siti sottoposti a modifiche post-traduzionali.



**Figura 2**

**Struttura cristallizzata di Caspasi-9**

Caspasi-9 è mostrata in blu con i loops del sito attivo in viola e N-terminale della SSCD in arancione. Il sito catalitico, Cys287 sul loop L2, è indicato dalla freccia.

Caspasi-9 è una proteasi ubiquitaria e sia “in vivo” sia “in vitro” si presenta, in assenza di segnali apoptotici, sotto forma di un monomero inattivo [10-25-26-27].

Caspasi-9 rappresenta un elemento chiave nella via intrinseca dell'apoptosi [25]. Tale via procede attraverso la formazione dell'apoptosoma.

Un primo modello ipotizza l'interazione con l'apoptosoma in grado di indurre un riarrangiamento del sito attivo della caspasi-9 monomerica. Questo determina la dimerizzazione della caspasi-9 che, in seguito a clivaggio, assume una conformazione attiva capace di processare altre caspasi poste nelle vicinanze; ciò permette di innescare una cascata di trasduzione del segnale apoptotico che coinvolge le diverse caspasi effettrici e termina nell'idrolisi di substrati citosolici e nucleari (Modello allosterico) [10-12].

Il secondo modello (Modello di induzione in prossimità) ipotizza un aumento di concentrazione della caspasi-9 monomerica in prossimità dell'apoptosoma; ciò permette di superare la barriera cinetica di dimerizzazione e favorire il contatto monomero-monomero, nel sito catalitico della caspasi, formando in questo modo il dimer che, dopo clivaggio, assume una conformazione attiva [10-12]. Il risultato complessivo è l'innescamento della cascata di traduzione del segnale apoptotico che, partendo dalla caspasi-9 iniziatrice, termina con l'attivazione diretta di caspasi-3 e in seguito delle altre caspasi effettrici.

### **Regolazione ed inibizione della caspasi-9**

L'attivazione della caspasi-9 può essere regolata a livello dei suoi siti di fosforilazione; le chinasi PKB-Akt e ERK2 sono coinvolte rispettivamente nella fosforilazione del residuo Ser196 e Thr125 di caspasi-9, determinando il blocco del processo proteolitico e l'inibizione della proteasi [24].

Un ulteriore livello di regolazione sembra essere l'influenza dell'ossido nitrico (NO) con effetto anti-apoptotico; il meccanismo responsabile per questo effetto protettivo consiste nella S-nitrosilazione della caspasi zimogena su residui di cisteine espresse nel sito catalitico [24].

L'attività dell'apoptosoma può essere, anche, modulata attraverso l'interazione diretta di due famiglie di inibitori che agiscono a diversi livelli: la famiglia di Bcl-2 e la famiglia delle IAP [26-28].

La famiglia di Bcl-2 comprende differenti membri con attività pro-apoptotica (Bax, Bak, Bcl-x<sub>S</sub>, Bid, Bim) e anti-apoptotica (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>) che mostrano tre regioni di omologia dette regioni BH (Bcl-2 homology regions). Queste proteine interagiscono con molecole della stessa famiglia formando omodimeri (es. Bcl-2/Bcl-2) oppure eterodimeri, interagendo con altre molecole della stessa famiglia (Bcl-2/Bax) e svolgono un ruolo modulatore della via intrinseca della morte cellulare [28].

Le proteine con attività pro-apoptotiche come Bid, Bim sono molecole considerate iniziatrici della via intrinseca apoptotica. Le proteine Bax, Bak fanno parte di un sottogruppo di molecole adattatrici; la mancanza di una di queste molecole determina l'assenza di una risposta di morte. [29]. Le proteine anti-apoptotiche proteggono la cellule dai numerosi stimoli apoptotici e sono essenziali per la sopravvivenza della cellule. Un esempio, Bcl-2 previene il rilascio di citocromo-c nel citoplasma e impedisce l'attivazione di caspasi-9 da parte dell'apoptosoma.

Le proteine della famiglia delle IAP (c-IAP1, c-IAP2, XIAP, N-IAP, Survina) contengono da una a tre copie del dominio BIR (Baculoviral IAP repeat) costituito da 80 residui di zinco e agiscono inattivando le caspasi mediante un meccanismo di associazione/sequestro. I differenti domini BIR hanno diverse funzioni; un esempio è il terzo dominio BIR (BIR3) di XIAP capace di inibire l'attività di caspasi-9 mediante il legame dell'N-terminale della SSCD impedendo la dimerizzazione dei monomeri [26]. Altre IAP sono in grado di inattivare le caspasi-3,-7 legandosi al sito attivo delle caspasi e impedendo l'interazione con il substrato.

Durante l'apoptosi l'inibizione delle IAP è contrastata da una proteina mitocondriale detta SMAC/DIABLO [30] rilasciata nel citosol insieme al citocromo-c quando la cellula riceve segnali di morte. Normalmente, SMAC/DIABLO è prodotta come proteina precursore non-apoptotica contenente una sequenza target mitocondriale (MTS). La funzione pro-apoptotica è raggiunta in seguito al trasporto nei mitocondri e al clivaggio della regione MTS; l'esposizione di cinque amminoacidi all' N-terminale, dopo il taglio della regione MTS, è responsabile dell'interazione con i domini BIR presenti sulle proteine IAP e l'inibizione delle loro funzioni [30].

### **Autoimmunità e Immunodeficienza**

L'immunità, ovvero lo stato di protezione dalle malattie infettive, ha componenti sia non specifiche sia specifiche. La componente non specifica, immunità innata, comprende un gruppo di meccanismi di resistenza alle malattie che non sono specifici per un particolare patogeno. Viceversa la componente specifica, immunità acquisita, è caratterizzata da una risposta specifica verso un componente estraneo all'organismo (non-self). La risposta immunitaria specifica coinvolge linfociti T e B attivati da antigeni non-self. I linfociti B riconoscono ogni tipo di macromolecola solubile non processata tramite il legame dell'antigene con specifici recettori di membrana, mentre i linfociti T riconoscono peptidi processati e presentati dalle molecole MHC di classe I o di classe II espese dalle cellule APC [1].

Come descritto in precedenza, il riconoscimento dell'antigene non è sufficiente per il processo di attivazione dei linfociti che richiede due segnali distinti. L'assenza del secondo segnale

costimolatorio può indurre apoptosi o tolleranza periferica all'antigene; quest'ultima conduce ad uno stato di quiescenza (anergia) dei linfociti [31].

Il secondo segnale è trasmesso dalle APC, attivate dall'ambiente infiammatorio, ai linfociti T e ai linfociti B dai linfociti T che riconoscono l'antigene presentato dagli stessi linfociti B.

L'attivazione è accompagnata dalla regolazione di specifici geni per molecole di superficie coinvolte nella proliferazione (CD25) e nelle funzioni effettrici dei linfociti [5].

L'attivazione, inoltre, stimola l'espressione di specifiche molecole coinvolte nel processo di spegnimento del sistema immunitario che induce apoptosi dei linfociti effettrici. Tuttavia, una piccola parte sopravvive andando a costituire un gruppo di linfociti memoria necessari per una risposta immunitaria più rapida e vigorosa ad una nuova esposizione dello stesso antigene [5].

Lo spegnimento della risposta immunitaria è fondamentale per il controllo del numero dei linfociti periferici e per ridurre il rischio di cross-reattività tra antigeni self e non-self [5].

Infatti il modello del "mimetismo molecolare" assume che la cross-reattività, dovuta a proteine virali dotate di sequenze peptidiche simili a quelle delle proteine self, sia coinvolta nella genesi delle malattie autoimmuni. In seguito all'eliminazione del patogeno, il sistema immunitario può continuare ad agire contro queste molecole self e indurre uno stato di autoimmunità.

### *Le malattie autoimmuni*

Le malattie autoimmuni possono essere classificate in due gruppi: malattie organo-specifiche e sistemiche [1]. Le prime sono caratterizzate dalla presenza di autoanticorpi o linfociti-T-effettori diretti contro antigeni bersagli espressi da un certo organo o ghiandola, perciò le manifestazioni della malattia sono in gran parte a carico di quel particolare organo. Le malattie autoimmuni sistemiche, invece, presentano autoanticorpi diretti contro un ampio spettro di antigeni e per tale ragione coinvolgono vari 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 auto-antigeni. Fanno parte di questa categoria anche alcune malattie autoimmuni organo-specifiche causate da auto-anticorpi capaci di esercitare un'attività agonista o antagonista sull'organo bersaglio; ad esempio nel morbo di Graves-Basedow anticorpi

anti-recettore del TSH causano un'iperfunzione tiroidea, mentre nella miastenia grave anticorpi contro il recettore dell'acetilcolina inibiscono la trasmissione dell'impulso neuro-muscolare [2].

Le malattie autoimmuni cellulo-mediate sono caratterizzate principalmente da linfociti T helper di tipo 1 (Th1) con la produzione di citochine pro-infiammatorie, quali IL-2, IFN $\gamma$  e linfotossina, e da linfociti T citotossici (Tc). Esempi di queste malattie autoimmuni sono il diabete mellito di tipo 1 oppure la sclerosi multipla in cui i linfociti Th1 e Tc aggrediscono rispettivamente le cellule  $\beta$ -pancreatiche e la mielina del sistema nervoso centrale [2].

### *Controllo e cause dell'autoimmunità*

Nell'organismo, il mantenimento della tolleranza agli autoantigeni è garantito da tre meccanismi diversi: -limitazione della reattività da parte di meccanismi regolatori, -sequestro degli antigeni self che li rende inaccessibili al sistema immunitario, -tolleranza dei linfociti T e B agli antigeni [5]. L'alterazioni di questi processi fisiologici può portare, quindi, all'attivazione di cloni di linfociti autoreattivi e allo sviluppo di reazioni umorali o cellulari contro antigeni self dell'organismo.

In generale, queste risposte sono secondarie alla stimolazione da parte di agenti infettivi (batteri, virus) o alterazioni intrinseche delle cellule del sistema immunitario.

Le infezioni possono scatenare la malattia attraverso meccanismi diversi:

- danneggiamento di un tessuto con liberazione di antigeni che non sono mai venuti in contatto con il sistema immunitario (antigeni sequestrati) e che quindi vengono riconosciuto come non-self;
- presenza in virus e batteri di antigeni identici o simili a normali componenti self (mimetismo molecolare) che possono determinare cross-reazione contro il self dopo che l'agente infettivo è stato eliminato;
- innesco di una risposta infiammatoria localizzata con un conseguente aumento della concentrazione di citochine. Queste determinano l'espressione di molecole MHC di classe II nelle APC che possono indurre un'attivazione inappropriata di linfociti T autoreattivi;
- attivazione policlonale non specifica di numerosi cloni di linfociti B con conseguente produzione di autoanticorpi.

I meccanismi non sono mutualmente esclusivi ma possono presentarsi insieme, determinando 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").

Molte malattie autoimmuni presentano un certo grado di familiarità e questo ha indotto molti studi a definire i fattori genetici coinvolti nel loro sviluppo. Nel complesso i dati ottenuti disegnano il quadro tipico delle malattie multifattoriali.

Un insieme di geni diversi possono influire nella suscettibilità genetica allo sviluppo della malattia che richiede, comunque, l'induzione da parte di fattori scatenanti (età, sesso, background genetico, esposizione a fattori infettivi e ambientali) [1].

Molti studi genetici hanno dimostrato che una certa malattia autoimmune è più frequente nei portatori di un determinato allele di un gene. Tuttavia, non è chiaro se questi geni sono coinvolti direttamente nello sviluppo della malattia oppure se l'associazione statistica è legata a fenomeni di "linkage disequilibrium", ovvero al fatto che quell'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.

### *Immunodeficienza*

Quando il sistema immunitario, invece, non è in grado di difendere l'organismo da agenti di malattia o dalle cellule tumorali, si parla di immunodeficienza. Questa condizione è causata da alterazioni che avvengono durante la maturazione e la differenziazione dei linfociti o degli organi linfoidei. Le immunodeficienze sono suddivise in due gruppi: - primitive o congenite e - secondarie o acquisite [1]. Le primitive sono causate da difetti genetici che alterano le funzioni innate o acquisite del sistema immune e vengono classificate in quattro gruppi principali sulla base della componente del sistema immunitario che risulta compromessa: linfociti B, linfociti T, cellule fagocitarie o del complemento. I difetti dei linfociti T comprendono disordini con alterazioni a carico della produzione di anticorpi da parte dei linfociti B. Le malattie dei fagociti comprendono alterazioni primitive a carico della motilità cellulare (chemiotassi) e dell'attività microbica [2].

Vengono considerate immunodeficienze secondarie quelle che originano dall'esposizione ad agenti esterni (chimici-fisici) o come conseguenza di infezioni batteriche o virali che possono condurre al deterioramento del sistema immunitario per l'insorgenza di una patologia in un individuo precedentemente sano. Le immunodeficienze secondarie sono più frequenti di quelle primarie e si manifestano in molti pazienti ospedalizzati [2].

Le manifestazioni cliniche delle immunodeficienze sono caratterizzate da frequenti infezioni che solitamente esordiscono come infezioni respiratorie ricorrenti. In seguito, la maggior parte dei pazienti con immunodeficienza finisce con il contrarre una o più infezioni batteriche gravi che persistono e in alcuni casi portano a malattie autoimmuni.

### **Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS)**

Come descritto in precedenza, il processo di spegnimento del sistema immunitario è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi numerica dei linfociti e della tolleranza periferica. Il difetto di questo sistema può causare malattie caratterizzate dall'accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari e da autoimmunità.

Alcuni modelli animali sono rappresentativi di questo quadro. I topi *lpr* (lymphoproliferation) e *gld* (generalized lymphoproliferation disease) sono portatori di mutazioni recessive a carico del gene che codifica Fas e del gene che codifica FasL. I topi *lpr* mostrano linfoproliferazione con linfadenopatia, splenomegalia, espansione policlonale di linfociti doppi negativi CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) e manifestazioni autoimmuni; i topi *gld* sono caratterizzati da linfoproliferazione (in assenza di DN e splenomegalia) e Lupus Eritematoso (LES) [32-33].

Questi modelli evidenziano il coinvolgimento di Fas nella genesi del quadro autoimmune e nella iperproliferazione per un difettoso spegnimento della risposta immunitaria.

Nell'uomo, un quadro clinico sovrapponibile è presente nei pazienti affetti da "Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa" (ALPS-OMIM#601859) [33-34-35]. La malattia si sviluppa in età pediatrica ed è caratterizzata da disordini linfoproliferativi con linfadenopatia-splenomegalia, manifestazioni autoimmuni (glomerulonefrite, sindrome di Guillian-Barrè, epatite, artrite, vasculite, LES) associate a citopenie, espansione periferica di linfociti DN, ridotta funzionalità del sistema Fas/FasL e ipergammaglobulinemie [33].

Il gene umano TNFRSF6 è presente sul tratto cromosomico 10q24.1, consiste di 9 esoni e 8 introni [35] e codifica per la proteina transmembrana Fas/Apo1/CD95. La proteina forma un omotrimerico sulla membrana cellulare dopo il legame con la proteina FasL/CD95L codificata dal gene TNFSF6. L'interazione Fas/FasL è coinvolta nel processo di spegnimento della risposta immunitaria e nell'attività citotossica dei linfociti T (CTL) dovuta all'interazione di FasL espresso dalle cellule citotossiche con Fas espresso sulle cellule target [20].

Alcuni pazienti ALPS presentano una mutazione eterozigote in questo gene e, attualmente, sono state descritte settanta mutazioni differenti con penetrazione clinica variabile [35].

Una caratteristica comune a tutte le mutazioni è un difetto nell'apoptosi indotta da Fas [32-35-36].

In alcuni pazienti affetti da ALPS, però, non sono state ritrovate mutazioni a carico del gene TNFRSF6; questo ha condotto ad una classificazione della malattia basata sulle caratteristiche molecolari riscontrate nei pazienti. E' possibile distinguere differenti forme di ALPS [37]:



\* pazienti ALPS-0 omozigoti per Fas [36] caratterizzati da una deficienza completa del recettore Fas che causa difetto apoptotico. I pazienti manifestano linfoproliferazione e manifestazioni autoimmuni;

\*mutazione nel gene TNFRSF6 con riduzione della funzionalità del recettore Fas (ALPS-Ia) [36].

I pazienti mostrano linfoproliferazione con accumulo di linfociti T e B, malattie autoimmuni e accumulo di linfociti DN nel sangue;

\*mutazione nel gene TNFSF6 codificante per FasL/CD95L (ALPS-Ib) [32] descritta in pazienti con LES, linfoproliferazione ma assenza di linfociti DN e splenomegalia;

\*mutazione nel gene di caspasi-10 (ALPS-IIa) e caspasi-8 (ALPS-IIb) [18-36]. L'interazione Fas/FasL porta al reclutamento della caspasi-8 insieme alla caspasi-10 per formare il complesso DISC. La caspasi-10 svolge un ruolo chiave nella cascata apoptotica indotta da Fas e la sua assenza conduce a linfoproliferazione. Questo indica un effetto negativo di caspasi-10 che non può essere superato da caspasi-8;

\*deficit funzionale del recettore Fas con mutazione sconosciuta (ALPS-III) [35] ma con fenotipo clinico e immunologico simile all'ALPS. I pazienti sono caratterizzati da ipergammaglobulinemia e numero elevato di linfociti DN;

\*mutazione nel gene di NRAS<sup>1</sup> con riduzione di fattori pro-apoptotici (ALPS-IV) [38]. La mutazione di un singolo nucleotide porta un cambiamento amminoacidico nel codone 13 (G13D) che determina una maggiore attività della proteina; questo causa un difetto apoptotico nei linfociti che conduce a manifestazioni cliniche simili all'ALPS [34];

\*ALPS-Im presente nei linfociti DN di pazienti ALPS-III portatori di una mutazione somatica eterozigote nel gene Fas. Durante lo sviluppo embrionale, una mutazione somatica nel gene del recettore Fas conduce ad un difetto apoptotico con conseguente accumulo di linfociti singoli positivi. E' ipotizzabile che i linfociti DN hanno origine da questi linfociti che hanno ricevuto un segnale di morte ma che non possono morire perché portatori del difetto in Fas [39].

Nel nostro laboratorio è stato identificato un gruppo di pazienti con un quadro clinico simile ai pazienti ALPS ma privi dell'espansione di linfociti DN necessari per la diagnosi di ALPS.

Questa forma incompleta di ALPS è stata denominata "*Malattia Autoimmune Linfoproliferativa di Dianzani*" (DALD/ALPS-III-OMIM#605233).

---

<sup>1</sup> Gene RAS (NRAS, KRAS, HRAS) codifica proteine di 21 kDa che sono membri della superfamiglia delle proteine che legano GTP, le quali hanno diverse funzioni intracellulari nel controllo dei segnali di proliferazione, crescita e apoptosi.

I linfociti T dei pazienti mostrano un difetto funzionale di Fas di indurre apoptosi (pur non avendo mutazioni a carico dei geni TNFRSF6, TNFSF6 o di caspasi-10), insieme ad una riduzione della risposta apoptotica stimolata da ceramide [5-32-40].

I genitori dei pazienti, che non presentano segni clinici, sono Fas-resistenti e ciò suggerisce una componente ereditaria alla base della malattia. E' possibile ipotizzare l'esistenza di mutazioni, a carico del pathway di Fas, che agiscono su molecole a valle del recettore determinando, così, una attività dominante negativa sulla funzione di Fas nella apoptosi.

Nell'uomo, l'ALPS è diagnosticata "in vitro" mediante l'analisi funzionale della sensibilità linfocitaria all'apoptosi indotta da Fas e l'identificazione delle manifestazioni cliniche abbinate ad un aumento dei linfociti DN [35].

L'ALPS, comunque, sembra presentare un quadro multifattoriale; i pazienti sono eterozigoti per la mutazione nel gene di Fas ma questo non è sufficiente per sviluppare la malattia infatti i genitori portatori della mutazione sono sani. Nessuna correlazione è osservata tra il tipo di mutazione e le diverse manifestazioni cliniche.

Il fatto che alcuni membri della famiglia, con mutazioni a carico del gene per il recettore Fas, non manifestino la malattia suggerisce che altri fattori genetici siano necessari per lo sviluppo della malattia. L'accumularsi di tali fattori, associato anche a fattori ambientali, porta allo sviluppo della malattia.

### **Ulteriori disordini linfoproliferativi**

#### *Immunodeficienza Comune Variabile (CVID)*

Un ulteriore disordine linfoproliferativo consiste nell' "*Immunodeficienza Comune Variabile*" (CVID-OMIM#240500) caratterizzata da ipogammaglobulinemia (IgA, IgG, IgM) e infezioni batteriche dell'apparato respiratorio come sinusite, otite, bronchite e polmoniti. In alcuni casi si possono sviluppare infezioni della pelle, delle vie urinarie, del sistema nervoso centrale e complicazioni gastrointestinali [23]. La sindrome insorge nella prima e terza decade di vita [41] e presenta un fenotipo variabile che non permette di determinare le cause alla base della malattia.

Alla CVID viene associata, anche, una elevata suscettibilità allo sviluppo di disordini linfoproliferativi (manifestando splenomegalia, linfadenopatia diffusa) e allo sviluppo di linfomi maligni (linfoma non-Hodgkin, carcinoma gastrico); l'alta incidenza di quest'ultimi indica la capacità della sindrome di alterare la risposta cellula-mediata [23].

Alcuni soggetti possono sviluppare manifestazioni autoimmuni (LES, Artrite Reumatoide, Sindrome di Sjogren, Anemia emolitica), indicando un anormale controllo dell'immunità, oltre che immunodeficienza [23-42].

Le alterazioni agiscono anche sulla risposta umorale, infatti i linfociti B, presenti in numero normale nel sangue periferico e tessuti linfatici, sono incapaci di secernere immunoglobuline [42].

L'eterogenicità degli aspetti clinici evidenzia il coinvolgimento nella malattia di più di un gene.

Fino ad oggi, la principale causa della malattia è attribuibile a un difetto della maturazione, attivazione e differenziamento dei linfociti B; in alcuni casi si è osservato un deficit nell'espressione di ICOS (inducibile T-cell costimulator), una molecola costimolatoria espressa dai linfociti T.

I pazienti deficienti per la molecola sembrano mostrare un segnale poco efficace dei linfociti T helper verso i linfociti B che conduce, così, ad una minore produzione anticorpale e alla formazione di cellule della memoria [23-42].

### *Sindrome Linfoproliferativa legata all'X (XLP)*

La “*Sindrome Linfoproliferativa legata all'X*” (XLP-OMIM#308240) è un disordine causato da mutazioni sul cromosoma X del gene SH2D1A codificante la proteina SAP (*Protein-associated-SLAM*) coinvolta nella regolazione della funzione linfocitaria. I pazienti mostrano difetti nella funzione dei linfociti T e delle cellule Natural Killer (NK) con assenza di NKT (Natural Killer-T) e sono caratterizzati da mononucleosi, linfoistiocitosi, ipogammaglobulinemia in seguito a infezione con Epstein-Barr virus. L'assenza di SAP conduce ad una mancata risposta citotossica verso cellule infettate dal virus che può determinare, anche, linfomi per proliferazione incontrollata dei linfociti B [42]. Recentemente, XLP è stata associata a mutazioni nel gene BIRC4 codificante XIAP (X-linked inhibitor-of-apoptosis) con deficit nell'espressione dell'inibitore delle caspasi. I pazienti mostrano una maggiore suscettibilità agli stimoli apoptotici (CD95 o TRAIL-R) e l'assenza di cellule NKT. In risposta a infezione da Epstein-Barr, i linfociti attivati sono sottoposti, per il deficit in XIAP, ad apoptosi accelerata che non permette l'eliminazione delle cellule infettate dal virus che saranno, così, in grado di proliferare [42].

**Background scientifico***Identificazione di una mutazione nel gene di caspasi-9*

Lavori precedenti svolti nel laboratorio di Immunologia hanno identificato una mutazione nel gene codificante per caspasi-9.

85 pazienti affetti da ALPS e 10 affetti da CVID sono stati sottoposti a screening genomico dell'esone 2-9, con relative regioni introniche, al fine di identificare nuovi geni coinvolti nello sviluppo dell'ALPS-III. La mutazione individuata è presente in posizione +710 (A/C) sul cDNA del gene di caspasi-9, nel frammento codificato dall'esone 5.

La variazione, nel sito catalitico della proteina, causa la sostituzione del codone CAC, codificante per istidina<sup>237</sup>, con il codone CCC codificante per una prolina.

```

1 MDEADRLLR RCRLRLVEEL QVDQLWDALL SRELFRRPHMI EDIQRAGSGS RRDQARQLII 60
61 DLETRGSQAL PLFISCLEDT GQDMLASFLR TNRQAAKLSK PTLENLTPVV LRPEIRKPEV 120
121 LRPETPRPVD IGSGGFGDVG ALESLRGNAD LAYILSMEPC GHCLIINNVN FCRESGLRTR 180
181 TGSNIDCEKL RRRFSSLHFM VEVKGDLTAK KMYLALLELA QQDHGALDCC VVVILSHGCQ 240
241 ASHLQFPGAV YGTDGCPVSV EKIVNIFNGT SCPSLGGKPK LFFIQACGGE QKDHGFEVAS 300
301 TSPEDESPGS NPEPDATPFQ EGLRTFDQLD AISSLPTPSD IFVSYSTFPG FVSWRDPKSG 360
361 SWYVETLDDI FEQWAHSEDL QSLLLRVANA VSVKGIYKQM PGCNFNLRKK LFFKTS

```

**Figura 3****Sequenza aminoacidica di Caspasi-9**

Sono mostrati gli aminoacidi della proteina caspasi-9.

In grassetto è indicato l'aminoacido istidina (H) in posizione 237.

La mutazione è presente in eterozigosi in un soggetto tra quelli sottoposti a screening: questo paziente (Paziente-1) presenta un quadro clinico compatibile con l'ALPS in assenza di una riduzione della funzionalità di Fas. Il soggetto mostra accumulo di linfociti negli organi secondari, con linfadenopatie, splenomegalie, trombocitopenie e una espansione dei linfociti DN. Il paziente manifesta anche un quadro clinico di CVID caratterizzato da un basso accrescimento staturale, infezioni respiratorie, bassi livelli di immunoglobuline e ridotta risposta dei linfociti T ai mitogeni "in vitro". In seguito, non avendo riscontrato mutazioni nel gene di caspasi-9 in altri pazienti affetti da ALPS (n=85) e, vista la duplice componente clinica del paziente-1, è stata ricercata la mutazione in pazienti affetti da immunodeficienza.

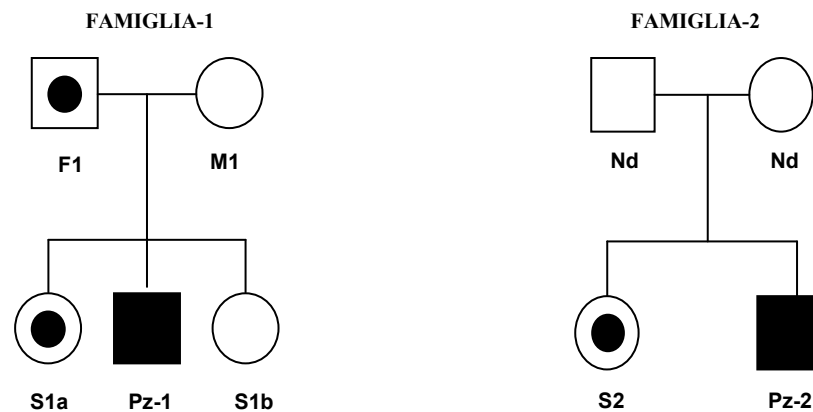
Questo ha permesso di individuare, all'interno di un campione di 10 pazienti, la stessa mutazione (A/C) in un secondo paziente (Paziente-2).

Il soggetto è un paziente affetto da CVID che mostra bassi livelli di IgM, infezioni respiratorie e la presenza di un linfoma di Burkitt.

Il quadro clinico dei pazienti manifesta una condizione molto complessa caratterizzata da differenti fattori che influiscono sull'analisi cellulare e molecolare.

Inoltre, dall'osservazione dell'albero genealogico del paziente-1 si nota la presenza della mutazione nella sorella e nel padre entrambi sani.

Nella famiglia del paziente-2, invece, i dati relativi ai genitori non sono disponibili ma la mutazione ha carattere ereditario in quanto presente anche nella sorella che, nonostante ciò, è sana (Figura 4).



**Figura 4**

#### **Albero genealogico delle famiglie dei due pazienti**

Il diagramma delle due famiglie mostra i soggetti malati portatori della mutazione in eterozigosi: Paziente-1 (Pz-1), Paziente-2 (Pz-2) e i portatori sani: Padre-1 (F1), Sorella-1a (S1a) Sorella-2 (S2). Mamma-1 (M1) e Sorella-1b (S1b) non presentano la mutazione.

Nd = dati non disponibili

#### *Studio della mutazione in caspasi-9*

Alcuni studi strutturali condotti “in vitro” [27] hanno suggerito che la variazione +710 (A/C) determina una sostituzione, sul sito catalitico della proteina, del codone CAC (codificante per istidina<sup>237</sup>) con il codone CCC (codificante per una prolina) conducendo ad una variazione strutturale e funzionale della caspasi-9.

Al fine di caratterizzare questa variazione, studi condotti nel nostro laboratorio hanno caratterizzato la mutazione di caspasi-9 e valutato gli effetti a livello cellulare e molecolare.

Gli esperimenti hanno evidenziato che la mutazione +710A/C altera la funzione di caspasi-9 e la rende inattiva. La caspasi-9 mutata viene espressa all'interno delle cellule, ma è incapace di attivarsi. Inoltre, la contemporanea presenza della forma mutata e wild-type ha dimostrato che la caspasi-9 mutata è in grado di interferire con la funzionalità della proteina wild-type, ciò ha suggerito un effetto “dominante negativo” della proteina mutata sulla proteina wild-type.

L'insieme dei dati ottenuti ha permesso di ipotizzare due possibili meccanismi per descrivere l'azione dominante negativa della forma mutata:

a) l'interazione della caspasi-9 mutata con l'apoptosoma, mediante i domini CARD, determina un cambio conformazionale che, tuttavia, non conduce alla dimerizzazione della proteasi impedendole di attivare le caspasi poste nelle vicinanze; b) l'associazione della caspasi-9 wild-type con l'apoptosoma determina la sua dimerizzazione. La forma della proteina wild-type attiva recluta molecole di caspasi-9 mutata ma non è in grado di attivarle.

A livello cellulare, è mostrato un difetto nell'attivazione di caspasi-9 in risposta agli stimoli apoptotici in tutti i soggetti portatori della mutazione in eterozigosi. Gli studi hanno valutato, anche, gli effetti della mutazione sulla proliferazione cellulare dato che i pazienti presentavano un quadro linfoproliferativo comune (ALPS nel paziente-1, linfoma di Burkitt nel paziente-2); questo ha suggerito un nuovo ruolo di caspasi-9 nel controllo dei processi non apoptotici.

Tutti i soggetti portatori della mutazione in eterozigosi hanno presentato un difetto nell'attivazione di caspasi-9 in risposta a stimoli apoptotici della via mitocondriale e della via estrinseca.

I risultati ottenuti sui linfociti dei soggetti appartenenti alle due famiglie hanno mostrato un deficit proliferativo nei soggetti con la mutazione.

L'indagine è stata approfondita valutando le funzioni effettrici associate ai linfociti T (secrezione di IL-2 e l'espressione di CD25) e B (produzione di IgM-IgG); i risultati ottenuti hanno mostrato una diminuzione di secrezione dell'IL-2 in tutti i portatori della mutazione e una diminuzione dell'espressione di CD25 in tutti i membri indipendentemente dalla mutazione di caspasi-9.

La produzione di IgG-IgM era difettiva solo nei pazienti e risultava normale nei restanti soggetti a prescindere dalla mutazione. Questi dati hanno suggerito la presenza di fattori genetici coinvolti nella genesi di tali difetti di attivazione; questi creano un "genotipo-fenotipo" molto complesso che impediscono di stabilire la reale dipendenza dalla mutazione anche se delineano un possibile coinvolgimento della caspasi-9 nello sviluppo di disordini linfoproliferativi e di immunodeficienze.

### **Scopo del lavoro**

Scopo del lavoro è stato quello di creare un sistema lentivirale, contenente la sequenza mutata di caspasi-9, per la trasduzione di linee cellulari tumorali e primarie al fine di indagare l'eventuale correlazione tra la mutazione in caspasi-9 e la proliferazione cellulare.

# MATERIALI E METODI

### **Plasmidi virali**

I plasmidi pMDLg/pRRE e pRSV-Rev (plasmidi per core-packaging), pMD2.VSVG (plasmide dell'envelope codificante la glicoproteina-G del virus della stomatite vescicolare) e il plasmide pCCL.PPT.hPGK.dNGFR.IRES.eGFP.Wpre sono stati donati dalla Dott.ssa Antonia Follenzi (Figura 5).

Il plasmide di trasferimento pCCL.PPT.hPGK.C9.IRES.eGFP.Wpre è stato ottenuto mediante clonaggio (Figura 6).

### **Produzione Lentivirus**

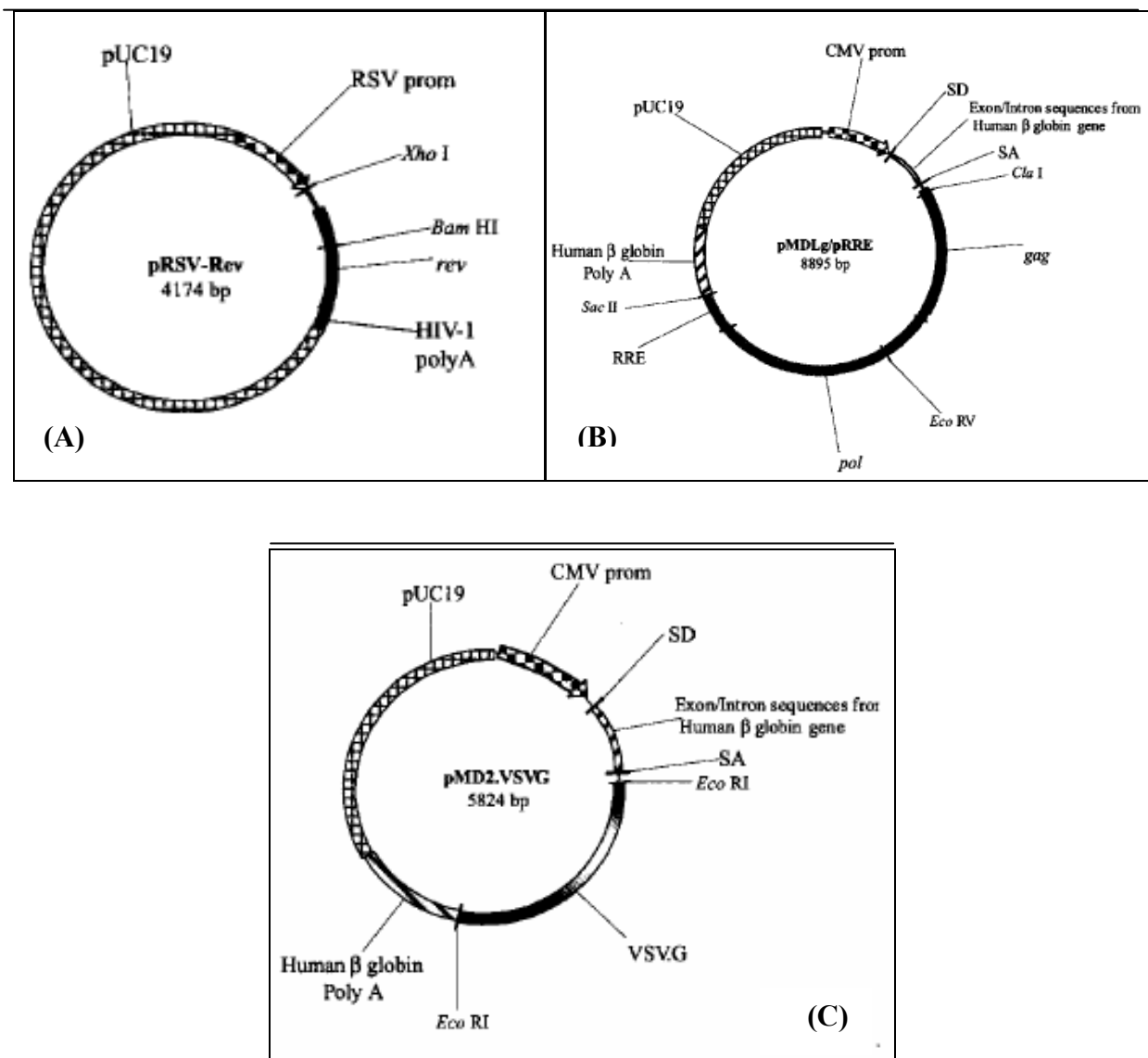
Particelle di vettori lentivirale sono state prodotte in cellule 293T ( $4.5 \times 10^6 / \text{Ø}10\text{cm}$ ) mediante co-trasfezione transiente con  $\text{CaCl}_2$  come descritto [44].

In dettaglio, sono stati usati 12 $\mu\text{g}$  del plasmide di trasferimento pCCL.dNGFR.eGFP o del plasmide pCCL.C9.eGFP, 3 $\mu\text{g}$  di plasmide pMD2.VSVG, 6.5 $\mu\text{g}$  di plasmide pMDLg/pRRE e 2.5 $\mu\text{g}$  di pRSV-Rev. I singoli plasmidi sono stati addizionati a 0.1X TE/ $\text{H}_2\text{O}$  (2:1), 2.5M  $\text{CaCl}_2$ , 2X HBS (Hepes Buffered Saline; 280mM NaCl, 100mM HEPES, 1.5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{pH}=7.12$ ) e la miscela è stata aggiunta alle cellule per 14-16h. In seguito, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno fresco. Dopo 24h, il terreno è stato raccolto, filtrato (filtri 0.45 $\mu\text{m}$ , Millipore, Billerica, MA) e centrifugato 19500 rpm per 140 minuti a 20°C senza freno. Il pellet è stato risospeso in 1X PBS e conservato a -80°C.

### **Valutazione efficienza vettori lentivirali**

Cellule 293T sono state piastrate ad una concentrazione di  $5 \times 10^4$ , in piastre a 24 pozzetti, con terreno IMDM (addizionato di 10% FBS (fetal bovine serum) e 1X Antibiotici; Gibco, New York, Usa) e incubate a 37° per 24h. Al termine dell'incubazione, diluizioni seriali ( $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ ) dei singoli vettori lentivirali sono state aggiunte alle cellule 293T; il giorno seguente alla trasduzione è stato aggiunto terreno IMDM nei singoli pozzetti e le piastre sono state incubate per 48-72h. L'efficienza di trasduzione è stata valutata osservando la percentuale di cellule positive per la fluorescenza data dalla GFP. Il titolo è stato calcolato con l'equazione della Legge di Poisson [45]:  $\text{Unità Trasducenti(TU/ml)} = [(\text{numero di cellule trasdotte}) \times (\text{percentuale di cellule positive})] / 100 \times (\text{fattore di diluizione})$ .



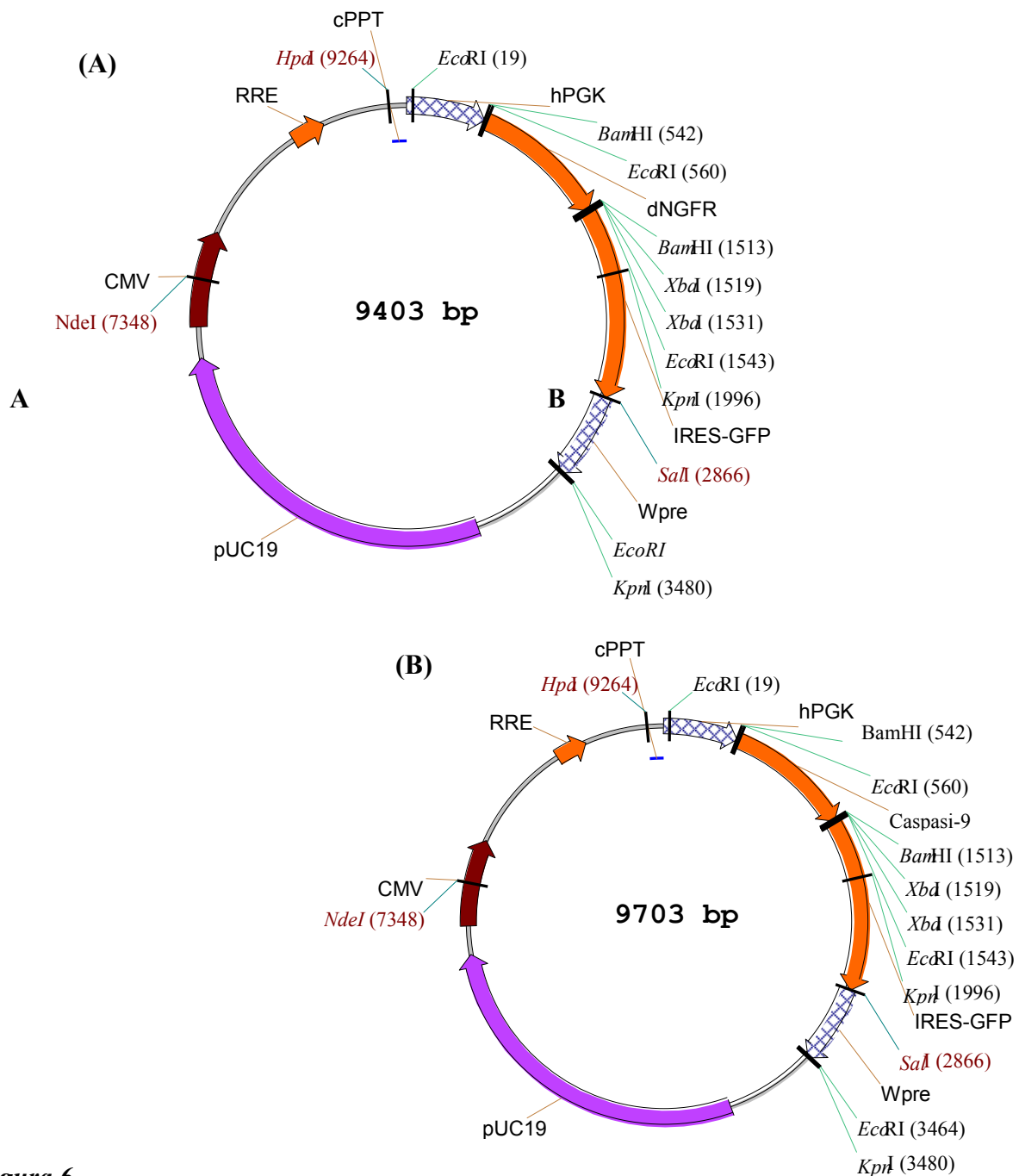


**Figura 5**

**Mappa del costrutto per il gene regolatorio REV (A), costrutto di incapsidamento (B), costrutto per la proteina del pericapside (C)**

Sono illustrate le sequenze principali dei costrutti [44]:

**pUC19**: sequenze plasmidiche di base; **CMV-prom**: promotore del Citomegalovirus umano; **SD**: sito donatore splicing; **SA**: sito accettore splicing; **VSV-G**: glicoproteina del virus della stomatite vescicolare; **gag**: gene gag dell'HIV-1; **pol**: sequenza del gene di HIV-1; **rev**: gene regolatorio REV di HIV-1; **RRE**: elemento responsivo a Rev; **polyA-seqHBS**: segnale di poliadenilazione del gene della  $\beta$ globina umana; **RSV prom**: promotore del virus del sarcoma di Rous



**Figura 6**

**Mapa dei costrutti**

**pCCL.PPT.hPGK.dNGFR.IRES.eGFP.Wpre (A), pCCL.PPT.hPGK.C9.IRES.eGFP.Wpre (B)**

Sono illustrate le sequenze principali dei costrutti di trasferimento:

**RRE:** elemento responsivo a Rev; **GFP:** cDNA per la green-fluorescence-protein; **C9 mut:** cDNA per la forma mutata di caspasi-9; **pUC19:** sequenza plasmidiche di base; **cPPT:** tratto polipurinico centrale; **PGK:** promotore della fosfoglicerato chinasi; **DNGFR:** cDNA per la forma tronca del attore di crescita dei neuroni; **IRES:** sito di entrata interno ribosomale del virus Epstein-Barr; **WPRE:** elemento di regolazione post-trascrizionale del virus dell'epatite-B

### **Trasduzione di cellule MT2 con vettore lentivirale**

Cellule MT2<sup>2</sup> (250x10<sup>3</sup>/pozzetto) sono state trasdotte, in piastra a 24 pozzetti, con concentrazioni differenti (MOI=1-2) di vettore lentivirale caspasi-9/GFP e sola GFP in terreno RPMI 1640 (addizionato di 1% L-Glutammina, 1X Antibiotici, 10% FBS, 10mM Hepes; Gibco, New York, Usa) in presenza di polibrene (1µg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). L'avvenuta trasduzione, dopo 24-48h, è stata valutata con analisi citofluorimetrica per la fluorescenza data dalla GFP. Dopo 30 giorni dalla trasduzione, le cellule MT2 sono state analizzate al citofluorimetro per valutare lo stato di trasduzione.

### **Western Blotting**

Cellule 293T trasfettate con il vettore pCCL.dNGFR.eGFP o pCCL.C9.eGFP sono state lisate in un buffer di lisi (20 mM Tris-HCl pH=7.5, 1% Triton, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 10% Glicerolo, 0.5mM DTT) contenente inibitori di proteasi (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, PMSF). I campioni ottenuti sono stati caricati su gel 10% SDS-PAGE ad una concentrazione di 150 µg. Le proteine sono state analizzate con mAb α-HA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), mAb α-caspasi-9 (Upstate, New York, Usa) e mAb α-GFP (Upstate, New York, Usa). Per la rivelazione degli anticorpi primari sono stati utilizzati mAb α-mouse e mAb α-rabbit coniugati ad HRP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

### **Valutazione espressione CD25 in cellule MT2 trasdotte**

L'espressione di CD25 in cellule MT2, trasdotte con vettore lentivirale caspasi-9/GFP e sola GFP, è stata valutata in citofluorimetria di flusso. L'immunofluorescenza è stata visualizzata mediante un anticorpo α-CD25 coniugato APC (Allofococianina) (Caltag-Laboratories, Burlingame, CA).

### **Isolamento e attivazione di PBMC**

Cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state isolate da sangue mediante separazione su gradiente di Ficoll. I linfociti T ottenuti sono stati attivati con 1 µg/ml di PHA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e risospesi in terreno RPMI 1640 (addizionato di 1% L-Glutammina, 1% Penicillina, Streptamicina, Gentamicina, 10% FBS in presenza di 50U/ml IL-2 per

---

<sup>2</sup> Linfociti T umani trasformati dal virus della leucemia tipo-1 (HTLV-1)

5 giorni [46]. L'attivazione cellulare è stata valutata con analisi citofluorimetrica mediante un anticorpo  $\alpha$ -CD25 coniugato FITC (Caltag-Laboratories, Burlingame, CA).

### **Purificazione e stimolazione di monociti**

PBMC sono stati isolati da una sacca di sangue concentrato (Buffy Coat) di donatori sani attraverso separazione su gradiente di Ficoll.

Monociti sono stati separati mediante sorting magnetico con il Kit IMACS (Milteny Biotec, Auburn, CA); la frazione ottenuta è stata caratterizzata in citofluorimetria con mAb  $\alpha$ -CD14 coniugato PE (Ficoeritrina) (Caltag-Laboratories, Burlingame, CA) [47-48].

Monociti (>95%, dato non mostrato) sono coltivati in terreno RPMI 1640 (addizionato di 10mM HEPES, 1% L-Glutammina, 1X Antibiotici, 10% FBS) ad una densità cellulare di  $5 \times 10^5$  cellule/ml in piastra a 48 pozzetti con e senza Lipopolissacaride batterico (LPS, 1 $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

### **Trasduzione di PBMC e monociti con vettore lentivirale**

PBMC attivati (200x10<sup>3</sup>/pozzetto) sono stati trasdotti con vettore lentivirale caspasi-9/GFP e sola GFP (MOI=2) in terreno RPMI 1640 (addizionato di 10mM HEPES, 1% L-Glutammina, 1X Antibiotici, 10% FBS) in presenza di polibrene (1 $\mu$ g/ml). Le cellule sono state centrifugate 2400 rpm per 1h a 22° senza freno. In seguito, il terreno è stato sostituito con terreno fresco in presenza di 50U/ml IL-2. Le cellule sono state incubate a 37°C per 2h [46]. Dopo l'incubazione, le cellule sono state ri-trasdotte con vettori lentivirali, centrifugate 2400rpm per 1h a 22° senza freno. Il terreno è stato sostituito con terreno fresco addizionato di 50U/ml IL-2. Dopo una incubazione a 37° per 24h, la trasduzione cellulare è stata valutata mediante analisi al citofluorimetro per la fluorescenza data dalla GFP.

La medesima analisi è stata condotta anche su monociti attivati con e senza LPS (1 $\mu$ g/ml) e trasdotti con vettore lentivirale C9/mut e sola GFP (MOI=2).

### **Analisi statistica**

I valori p value sono stati ottenuti impiegando il test t-student ( $p < 0.05$ ).

# RISULTATI

---

### **I vettori lentivirali mostrano una efficienza di trasduzione su cellule 293T**

Gli studi condotti in precedenza hanno permesso di riscontrare la mutazione H237P a carico del gene di caspasi-9; la mutazione, per effetto “dominante negativo”, impedisce l’attività della forma wild-type nelle funzioni pro-apoptotiche. Questi studi hanno mostrato, anche, un coinvolgimento della caspasi-9 nel controllo della proliferazione cellulare.

Al fine di indagare ulteriormente gli effetti della mutazione in differenti sistemi cellulari, sono stati generati vettori lentivirali contenenti il cDNA della forma mutata di caspasi-9 e il cDNA della proteina GFP.

I diversi costrutti di trasferimento (pCCL.dNGFR.eGFP e pCCL.C9.eGFP) sono stati co-trasfettati in cellule 293T con i costrutti codificanti per le proteine strutturali e regolatorie necessarie per la produzione di particelle di vettore lentivirale (Materiali e Metodi).

Una volta ottenute le particelle lentivirali, è stata valutata la capacità di trasduzione dei singoli vettori mediante analisi citofluorimetrica, utilizzando la proteina GFP come tracciante.

Le cellule 293T trasdotte con i vettori lentivirali caspasi-9/GFP e sola GFP hanno mostrato incrementi della percentuale di fluorescenza proporzionali alle diverse concentrazioni di particelle virali utilizzate (Figura 7). Questi dati hanno permesso di dimostrare l’efficienza di trasduzione dei vettori lentivirali prodotti. La valutazione della capacità di trasduzione cellulare è, quindi, effettuata quando la proteina GFP, codificata dal cDNA del transgene inserito, è prodotta all’interno della cellula. Tuttavia, la fluorescenza della proteina GFP non è indice di una espressione della proteina caspasi-9; infatti la sequenza codificante per la GFP è posta sotto il controllo di un promotore differente da quello per la sequenza codificante la caspasi-9 (Figura 6).

Al fine di verificare l’espressione di quest’ultima, è stato condotto un saggio di Western Blot su lisato totale di cellule 293T trasfettate con i singoli costrutti di trasferimento pCCL.dNGFR.eGFP e pCCL.C9.eGFP. Le cellule 293T esprimono bassi livelli di caspasi-9 endogena.

Le cellule 293T trasfettate con il costrutto contenente il cDNA della forma mutata di caspasi-9, fusa al tag HA, hanno mostrato un unico segnale compatibile con la presenza della forma inattiva della proteina a 55 kDa (Figura 8), la banda corrispondente alla forma attiva non era presente (35kDa).

Le cellule non trasfettate esprimono livelli inferiori al limite di detectabilità del sistema.

Questi dati hanno dimostrato che la caspasi-9 mutata veniva espressa all’interno della cellula ma era incapace di attivarsi (Figura 8). Inoltre, le cellule 293T trasfettate con i diversi costrutti hanno mostrato una banda ad un’altezza di 26kDa corrispondente alla proteina GFP (Figura 8).

### **Le cellule MT2 sono trasdotte dai vettori lentivirali**

Gli esperimenti condotti sui linfociti dei soggetti appartenenti alle famiglie dei pazienti, hanno mostrato un'associazione tra la forma mutata di caspasi-9 e difetti nella regolazione della proliferazione linfocitaria. I risultati hanno suggerito che la caspasi-9 sia coinvolta nello sviluppo di disordini linfoproliferativi e immunodeficienze. Tuttavia, la sola mutazione in caspasi-9 non è sufficiente a dare origine alla malattia; infatti, alcuni soggetti portatori della mutazione in caspasi-9 non hanno mostrato un fenotipo compatibile con quello dei pazienti.

Questi dati hanno suggerito la presenza di fattori genetici coinvolti nella genesi di difetti della attivazione creando un quadro "genotipo-fenotipo" molto complesso che impediscono di stabilire la reale dipendenza dalla mutazione.

Al fine di definire il ruolo della mutazione sulla proliferazione linfocitaria, svincolandola dal contesto genetico, è stata trasdotta la linea cellulare MT2 con il vettore lentivirale codificante per il cDNA della forma mutata di caspasi-9, fusa a GFP utilizzato come tracciante, o per la sola GFP. Per confermare l'avvenuta trasduzione, le cellule MT2 sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica per valutare l'intensità di fluorescenza data dalla proteina GFP.

I dati relativi alle differenti trasduzioni (Figura 9) hanno mostrato un aumento proporzionale della percentuale di cellule positive al marcatore GFP, rispetto alle diverse concentrazioni di vettore utilizzato. Questi dati hanno confermato l'avvenuta trasduzione della linea cellulare.

Le cellule MT2 sono state analizzate al citofluorimetro, anche, dopo 30 giorni dalla trasduzione con vettore lentivirale. Come mostrato in figura 10, le cellule MT2 hanno mantenuto lo stato di trasduzione.

### **La trasduzione lentivirale di cellule MT2 induce un aumento dell'espressione di CD25**

Come già evidenziato in precedenza, i due pazienti di questo studio condividono sul piano clinico un quadro linfoproliferativo; questo ha suggerito un nuovo ruolo di caspasi-9 nel controllo dei processi cellulari non-apoptotici quali la regolazione della proliferazione cellulare. Inoltre, alcuni studi [18-19] hanno dimostrato la capacità delle caspasi di regolare l'espressione di molecole di superficie (CD25) e la produzione di citochine (IL-2). Pertanto, al fine di verificare il ruolo della mutazione in caspasi-9 sulla proliferazione cellulare, è stata valutata l'espressione del recettore CD25 tramite analisi al citofluorimetro. L'analisi è stata compiuta su cellule MT2 trasdotte con il vettore lentivirale codificante per la caspasi-9 mutata o per la sola GFP e su cellule non trasdotte. Le cellule analizzate presentavano la stessa percentuale di trasduzione (85%, dato non mostrato).

Analizzando i dati relativi all'espressione del recettore CD25 in cellule trasdotte e cellule di controllo (Figura 11A-B), è stata osservata una percentuale di cellule positive al recettore CD25 paragonabile in tutte le condizioni; tuttavia, l'analisi delle mediane ha mostrato una maggiore espressione di molecole CD25 in cellule trasdotte con il vettore lentivirale caspasi-9/GFP rispetto alle cellule di controllo non trasdotte (Figura 11C). ( $p < 0.05$ ).

Tale aumento è riconducibile al possibile effetto della mutazione di caspasi-9 sul controllo della proliferazione cellulare; questa determina alterazioni nei meccanismi di induzione del sistema IL-2/IL-2R [18-19] coinvolto nelle fasi iniziali della proliferazione linfocitaria. Tuttavia, la presenza di cellule MT2 trasdotte con il vettore lentivirale GFP ha permesso di osservare la capacità della particelle lentivirali di influenzare, in parte, l'attivazione cellulare con un aumento dell'espressione del recettore CD25. Infatti, le cellule trasdotte con la sola GFP hanno presentato valori di mediana per il recettore CD25 superiori a quelli ottenuti dall'analisi delle cellule di controllo non trasdotte (Figura 11C). ( $p < 0.05$ ).

L'aumento dell'espressione del recettore, in cellule MT2 trasdotte con la forma mutata di caspasi-9, è in contrasto con i risultati ottenuti sui linfociti dei soggetti delle famiglie dei pazienti. Infatti, gli esperimenti hanno presentato una diminuzione di espressione del recettore CD25.

Queste differenze sembrano sostenere la presenza di altri fattori genetici, in queste due famiglie, coinvolti nella genesi di tali difetti di attivazione.

### **PBMC e monocyti mostrano una efficienza di trasduzione**

La valutazione dell'espressione in membrana del recettore CD25 ha sostenuto, ulteriormente, l'ipotesi di un eventuale coinvolgimento della caspasi-9 nel controllo della proliferazione cellulare. Questi risultati sono parzialmente inficiati dal fatto che le cellule MT2 sono cellule di derivazione tumorale e quindi un modello utile, ma non del tutto sovrapponibile ai linfociti in coltura primaria. Per questa ragione, sono stati allestiti degli esperimenti di trasduzione lentivirale su colture di PBMC.

PBMC di soggetti sani e privi di mutazione sono stati attivati per 5 giorni con PHA (1 $\mu$ g/ml) e 50U/ml IL-2. Dopo aver valutato l'attivazione delle cellule (Figura 12), i PBMC sono stati trasdotti con il vettore lentivirale contenente la forma mutata di caspasi-9 o la sola GFP.

Come mostrato in figura 13, i PBMC trasdotti presentavano la stessa percentuale di trasduzione (15-17%). Tuttavia, l'analisi al citofluorimetro ha mostrato una mortalità elevata delle cellule trasdotte con i vettori lentivirali 48 ore dopo la trasduzione (Figura 14).



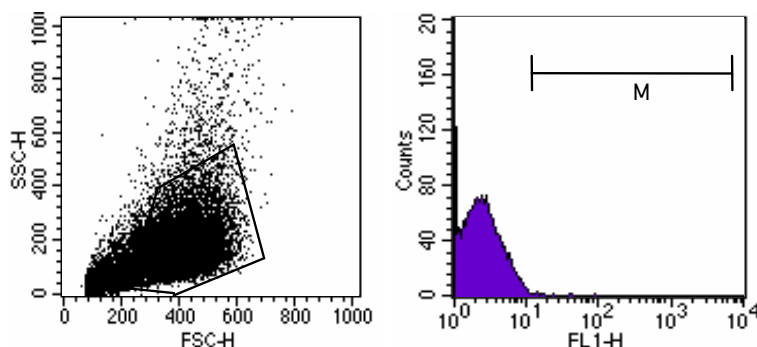
I vettori lentivirali sono stati utilizzati, anche, per la trasduzione di monociti, di soggetti sani e privi di mutazione, in presenza o assenza di LPS. L'analisi è stata compiuta al citofluorimetro.

Analizzando i dati relativi alle percentuali di cellule positive alla proteina GFP (Figura 15), è stata osservata una pari condizione di trasduzione tra le cellule con caspasi-9 e sola GFP e l'incapacità dello stimolo LPS di influenzare la trasduzione con vettori lentivirali. Infatti, le cellule trasdotte in presenza e assenza dello stimolo LPS hanno presentato la stessa percentuale di trasduzione (20-22%).

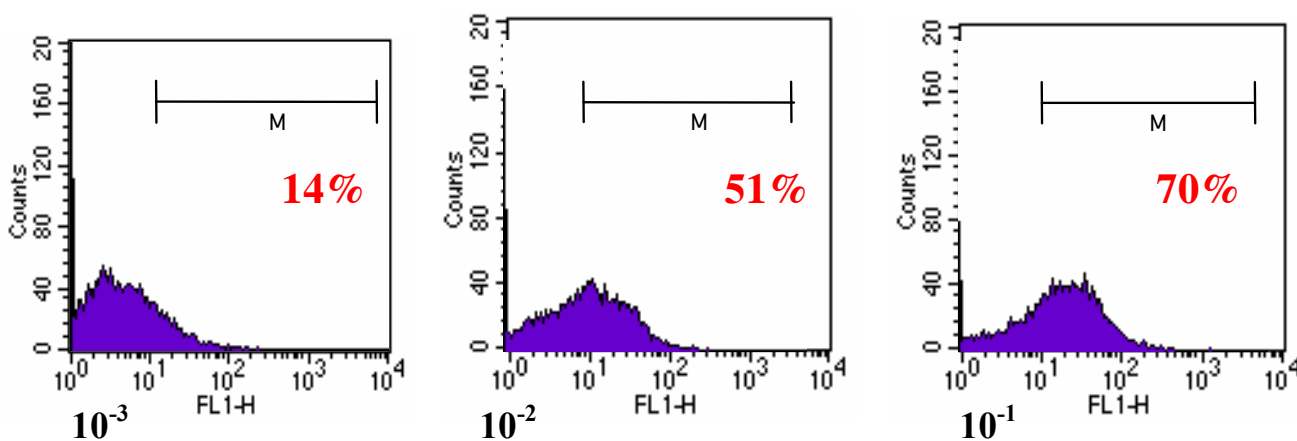
L'analisi al citofluorimetro, dopo sei giorni dalla trasduzione, ha mostrato una totale mortalità delle cellule in coltura (dato non mostrato).

L'insieme di questi dati ha evidenziato una buona efficienza di trasduzione virale delle cellule primarie. L'elevata mortalità ha suggerito la presenza di variabili (tipo di cellule, numero di particelle virali, uso di agenti per la trasduzione) in grado di influenzare la trasduzione virale determinando effetti indesiderati.

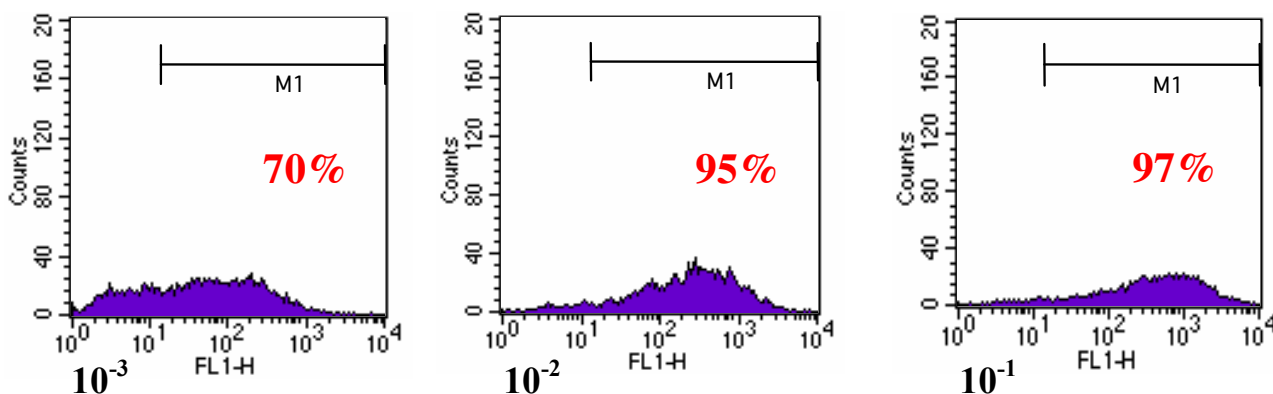
### Non trasdotte



### Caspasi-9 mutata



### GFP

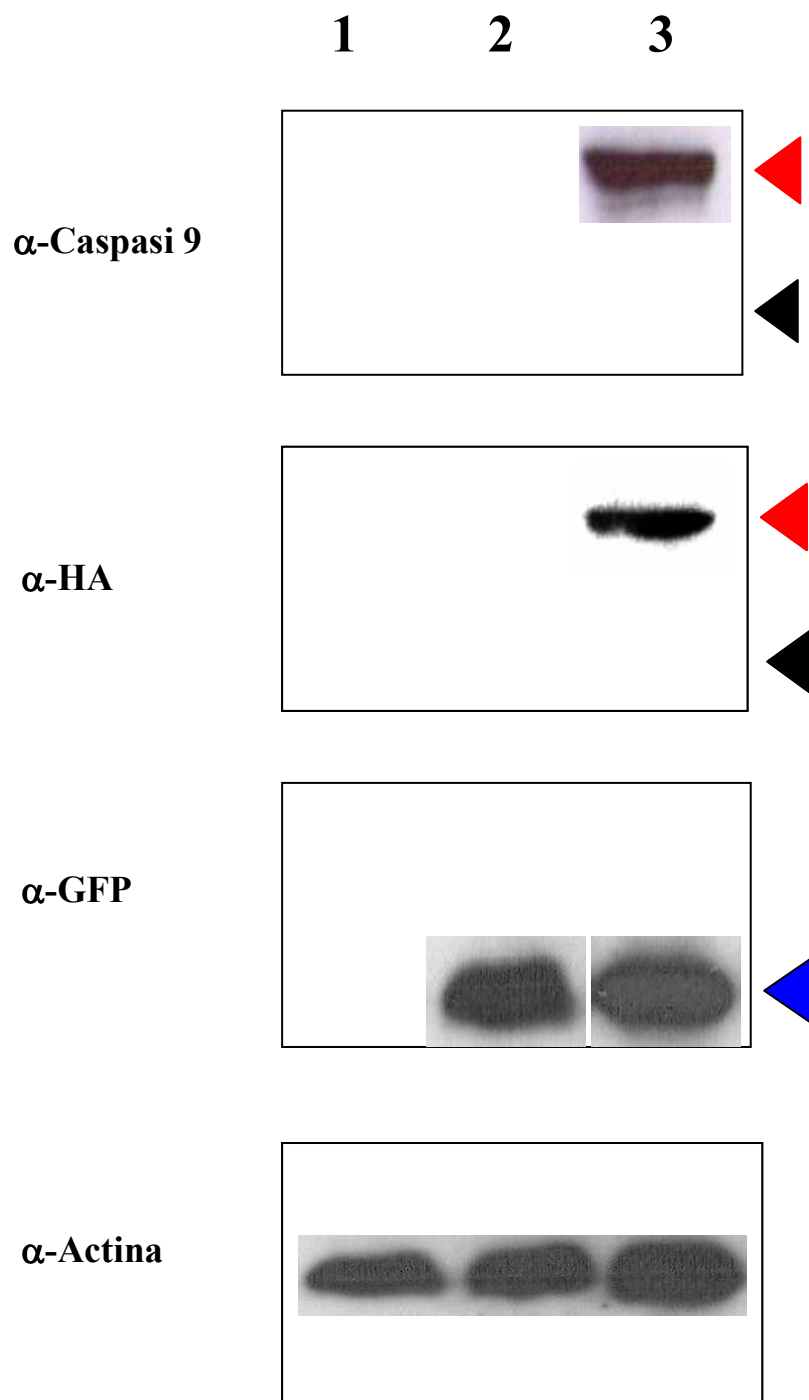


**Figura 7**

#### Valutazione dell'efficienza di trasduzione dei vettori lentivirali su cellule 293T

Le cellule 293T sono trasdotte con concentrazioni differenti di vettore lentivirale C9mut/GFP e sola GFP ( $10^{-3}$  a  $10^{-1}$ ). L'intensità di fluorescenza è valutata, con analisi al citofluorimetro, 48h dopo la trasduzione.

Le percentuali indicano le cellule positive alla GFP.



**Figura 8**

**Western Blot di lisati cellulari ottenuti da cellule 293T trasfettate**

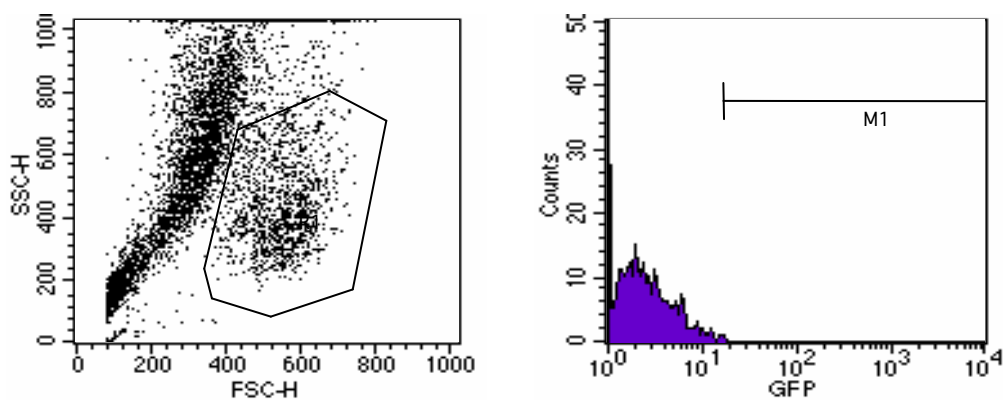
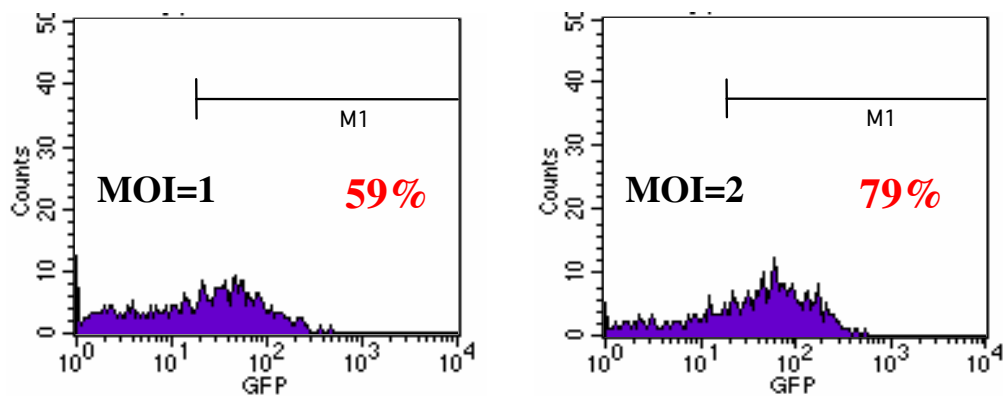
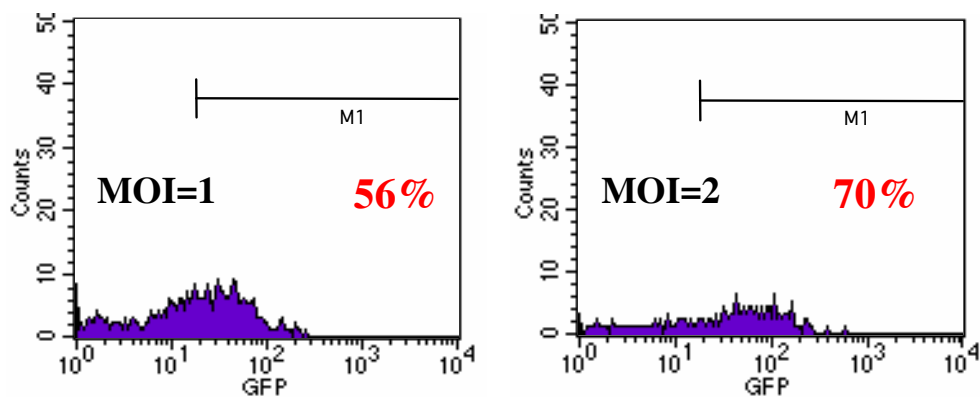
Cellule 293T non trasfettate (1); costrutto di trasferimento contenente il cDNA per la sola GFP (2); costrutto di trasferimento contenente il cDNA della caspasi-9 mutata, fusa all'HA (3).

La rilevazione è effettuata con mAb  $\alpha$ -HA,  $\alpha$ -caspasi-9 o  $\alpha$ -GFP.

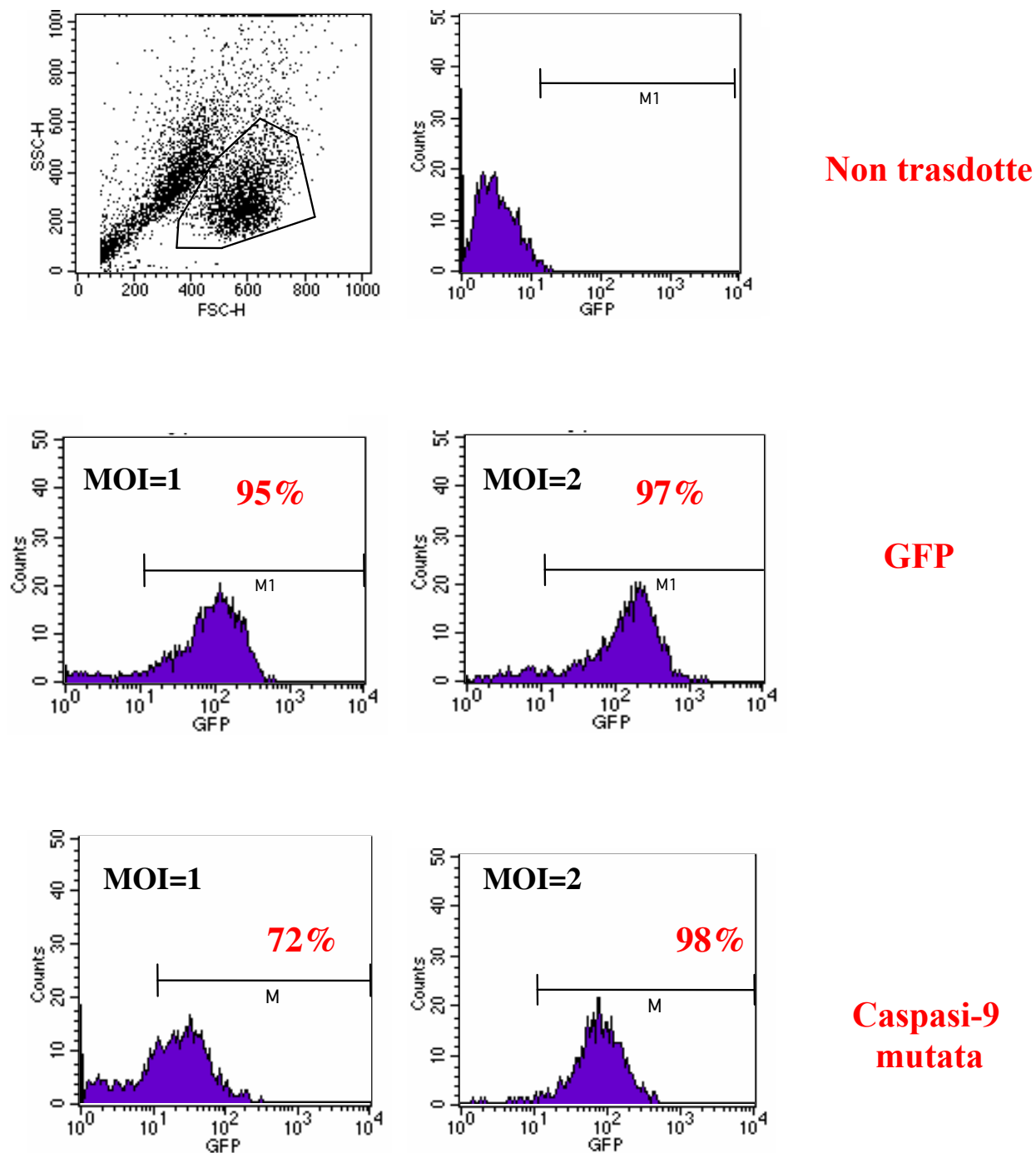
Le frecce rosse indicano la banda corrispondente alla forma inattiva di caspasi-9 (55kDa), le frecce nere indicano la banda della forma attiva di caspasi-9 (35kDa).

La freccia blu indica la banda corrispondente alla proteina GFP (26kDa).

La normalizzazione è verificata tramite mAb  $\alpha$ -actina.

**Non trasdotte****GFP****Caspasi-9 mutata****Figura 9****Valutazione della trasduzione lentivirale nelle cellule MT2**

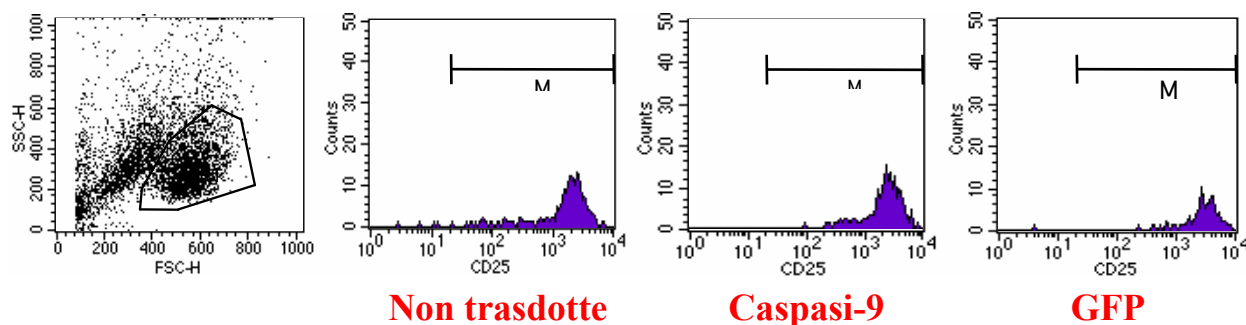
Analisi citofluorimetrica di cellule MT2, 48h dopo la trasduzione, con vettore lentivirale C9mut/GFP e sola GFP (MOI=1-2). Le percentuali indicano le cellule positive alla GFP:



**Figura 10**

**Analisi al citofluorimetro di cellule MT2 dopo 30 giorni dalla trasduzione**

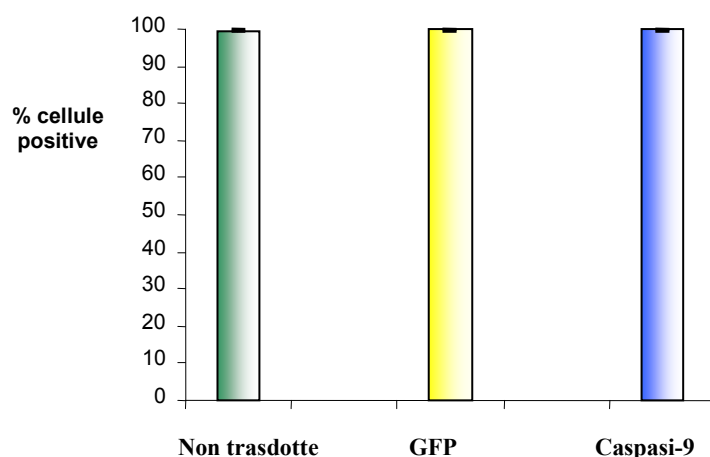
Cellule MT2 trasdotte con vettore lentivirale C9mut/GFP e sola GFP (MOI=1-2) sono analizzate al citofluorimetro dopo 30 giorni dalla trasduzione. Le percentuali indicano le cellule positive alla GFP.



**Figura 11**

**Analisi citofluorimetrica dell'espressione del recettore CD25 in cellule MT2 trasdotte**

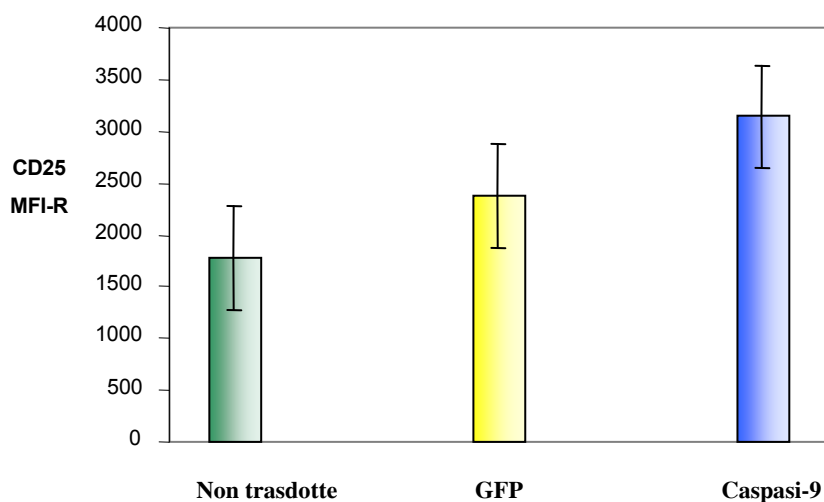
(A) Cellule MT2 trasdotte con vettore lentivirale C9mut/GFP e sola GFP (MOI=2) sono analizzate al citofluorimetro, 48h dopo la trasduzione, tramite anticorpo  $\alpha$ -CD25.



**(B)**

Percentuale di cellule MT2 positive al recettore di membrana CD25.

Le cellule MT2 trasdotte con lentivirus C9mut/GFP e sola GFP sono analizzate 48h dopo la trasduzione.

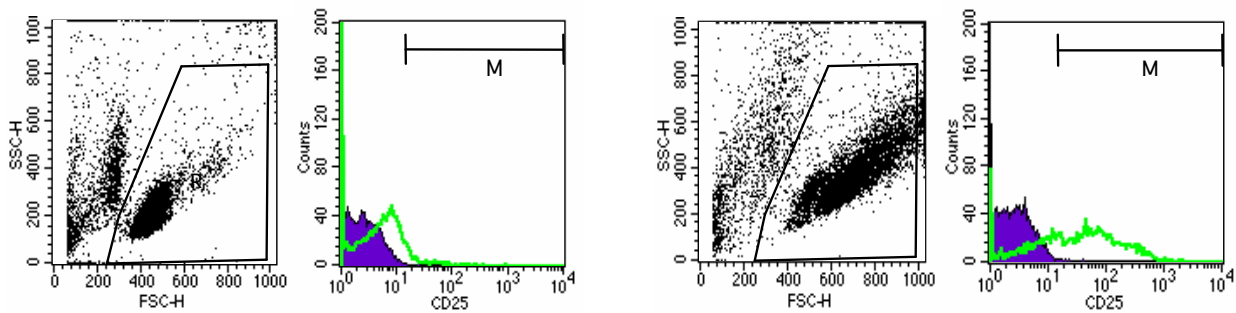


**(C)**

Espressione del recettore CD25 in cellule MT2 trasdotte con lentivirus C9mut/GFP e sola GFP 48h dopo la trasduzione.

I risultati sono espressi come rapporto dell'intensità media di fluorescenza (MFI-R).

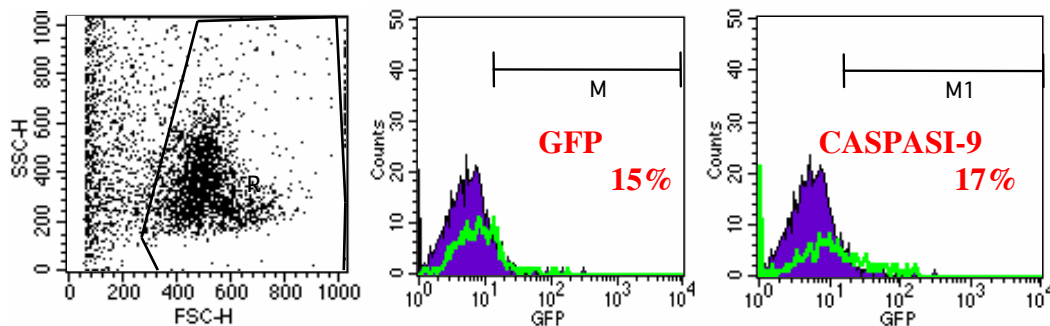
( $P < 0.05$ , t-student).



**Figura 12**

**Analisi al citofluorimetro di PBMC attivati dopo 5 giorni**

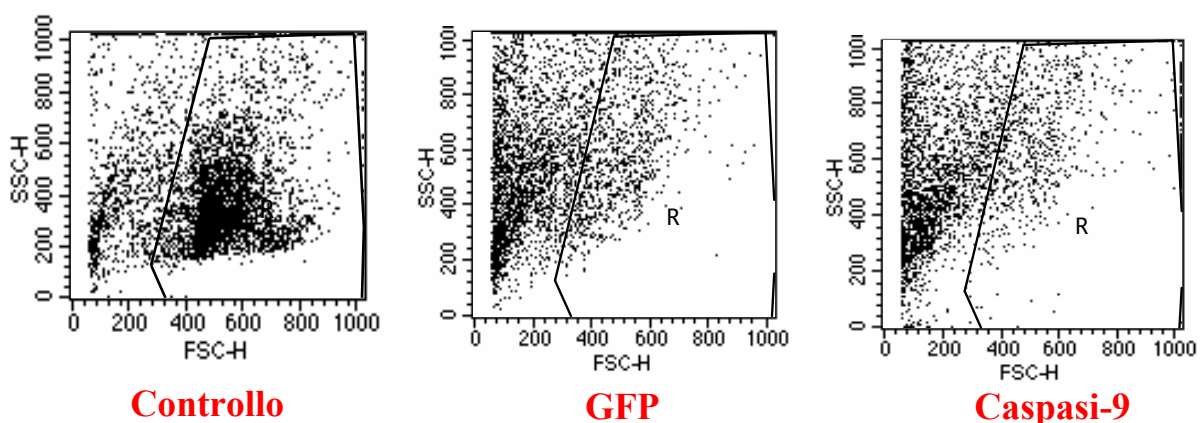
PBMC di soggetti sani sono coltivati con e senza PHA (1 $\mu$ g/ml) e IL-2 (50U/ml) per 5 giorni. L'attivazione dei PBMC è valutata tramite espressione del recettore CD25.



**Figura 13**

**Trasduzione con vettori lentivirali di PBMC attivati**

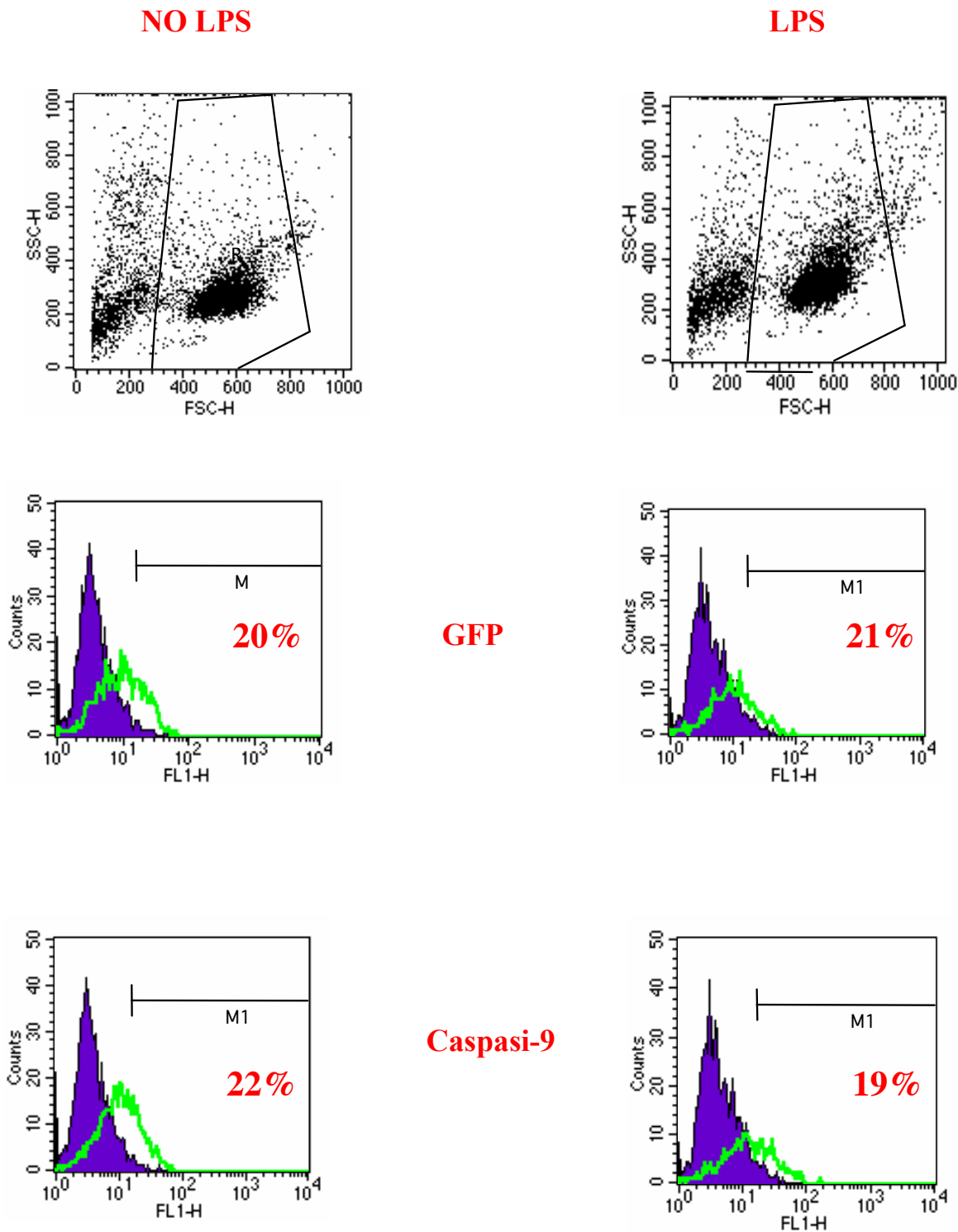
PBMC di donatori sani attivati sono trasdotti con vettore lentivirale C9mut/GFP e sola GFP (MOI=2). L'intensità di fluorescenza GFP è valutata al citofluorimetro 24h dopo la trasduzione. Le percentuali indicano le cellule positive alla GFP.



**Figura 14**

**Mortalità cellulare di PBMC trasdotti con vettore lentivirale**

PBMC di donatori sani trasdotti con vettore lentivirale C9mut/GFP e sola GFP sono analizzati al citofluorimetro 48h dopo la trasduzione.



**Figura 15**

**Trasduzione di monociti con vettore lentivirale**

Monociti di donatori sani sono trasdotti con vettore lentivirale C9mut/GFP e sola GFP (MOI=2) con e senza LPS (1 $\mu$ g/ml). Le cellule sono analizzate al citofluorimetro dopo 24h dalla trasduzione. Le percentuali indicano le cellule positive alla GFP.



# DISCUSSIONE

---

Un lavoro svolto, precedentemente, nel nostro laboratorio ha identificato, in due pazienti, una sostituzione nucleotidica in eterozigosi in posizione +710 (A/C) nell'esone-5 del gene codificante per caspasi-9. La mutazione altera la funzione di caspasi-9 che mutata viene espressa all'interno delle cellule, ma è incapace di attivarsi. Inoltre, la caspasi-9 mutata è in grado di interferire con la funzionalità della proteina wild-type suggerendo un effetto "dominante negativo" della proteina mutata sulla forma wild-type.

I risultati hanno mostrato un difetto nell'attivazione di caspasi-9 in risposta agli stimoli apoptotici.

Gli studi condotti sui pazienti, che presentano un fenotipo comune linfoproliferativo, hanno suggerito un nuovo ruolo di caspasi-9 nel controllo dei processi cellulari non-apoptotici.

Gli esperimenti hanno dimostrato alterazioni nella proliferazione linfocitaria e nelle funzioni effettrici dei linfociti T e B (secrezione di IL-2, espressione del recettore CD25 e produzione di IgG-IgM). Al fine di indagare l'effetto della mutazione in caspasi-9 in differenti sistemi cellulari, è stato generato un sistema lentivirale per la trasduzione di linee cellulari tumorali e primarie. L'efficienza di trasduzione dei singoli vettori è stata valutata su cellule 293T; l'analisi al citofluorimetro ha mostrato un aumento proporzionale della percentuale di fluorescenza, data dalla GFP, rispetto alle diverse concentrazioni di particelle virali.

La fluorescenza della proteina GFP non è indice di una espressione di caspasi-9; infatti la sequenza codificante per la GFP è posta sotto il controllo di un promotore differente da quello per la sequenza codificante la proteina caspasi-9. Per questo motivo, al fine di valutare l'espressione della forma mutata di caspasi-9 e della proteina GFP, è stato condotto un saggio di Western Blot su cellule 293T trasfettate con i singoli costrutti di trasferimento. Il saggio ha permesso di dimostrare che la caspasi-9 mutata viene espressa all'interno delle cellule, ma è incapace di attivarsi.

Le cellule 293T trasfettate con il costrutto per la sola GFP hanno mostrato l'espressione della proteina, confermata anche dalla fluorescenza osservata dall'analisi al citofluorimetro.

Come evidenziato in precedenza, gli esperimenti condotti sui membri delle famiglie dei pazienti hanno mostrato difetti nella regolazione della proliferazione cellulare; tali difetti, però, in alcuni casi erano indipendenti dalla mutazione in caspasi-9. Questo ha suggerito la presenza di fattori genetici coinvolti nella genesi di tali difetti di attivazione che creano un "genotipo-fenotipo" molto complesso.

Al fine di valutare un coinvolgimento di caspasi-9 nella proliferazione cellulare, scorporandola dall'effetto di altri fattori intrinseci e inibizioni aspecifiche, la linea cellulare MT2 è stata trasdotta

con vettori lentivirali codificanti per il cDNA della forma mutata di caspasi-9, fusa a GFP utilizzato come tracciante, o per la sola GFP.

L'analisi è stata compiuta su cellule MT2 trasdotte con differenti concentrazioni di vettore; i risultati hanno mostrato un aumento proporzionale della percentuale di cellule positive al marcatore GFP confermando l'avvenuta trasduzione della linea cellulare.

Alcuni studi [18-19] hanno dimostrato la capacità delle caspasi di regolare l'espressione di molecole di superficie (CD25) e la produzione di citochine (IL-2); pertanto, è stata valutata l'espressione in membrana del recettore CD25.

I risultati ottenuti hanno mostrato la stessa percentuale di cellule positive al recettore CD25 tra le cellule MT2 trasdotte e le cellule di controllo.

L'analisi delle mediane ha presentato valori superiori nelle cellule trasdotte con il vettore caspasi9/GFP rispetto alle cellule non trasdotte, indicando una maggiore espressione delle molecole CD25 nelle cellule trasdotte. Tale aumento è riconducibile al possibile effetto della mutazione di caspasi-9 sul controllo della proliferazione cellulare.

La presenza di cellule MT2 trasdotte con il vettore contenente la sola GFP ha permesso di osservare la capacità delle particelle lentivirali di influenzare, in parte, l'attivazione cellulare.

Alcuni studi hanno dimostrato che la trasduzione con vettori lentivirali non ha conseguenze sul fenotipo e funzione delle cellule [46]; in contrasto con questo modello, altri studi [48-49] hanno dimostrato che la trasduzione dei linfociti con lentivirus è incapace di cambiare il fenotipo di quest'ultimi. Il fatto che diversi studi abbiano ottenuto risultati contrastanti suggerisce che molte variabili possano influire sulla trasduzione virale (tipo di cellule, numero di particelle virali, uso di agenti per la trasduzione) determinando effetti differenti.

Nel loro insieme, questi dati hanno mostrato la capacità delle cellule MT2 trasdotte con caspasi9/GFP di esprimere in membrana un maggior numero di molecole CD25 rispetto alle cellule di controllo.

Tale aumento ipotizza un meccanismo cellulare per garantire l'interazione di CD25 con la citochina IL-2 che mostra un difetto nella secrezione (difetto mostrato nei soggetti portatori della mutazione). La forma mutata di caspasi-9 conduce ad alterazioni nei meccanismi di induzione del sistema IL-2/IL-2R [18-19] coinvolto nelle fasi iniziali della proliferazione linfocitaria.

Naturalmente, sarebbe necessario compiere studi biochimici per avvalorare tale ipotesi.

E' interessante osservare che l'aumento del recettore CD25, in seguito alla trasduzione con la forma mutata di caspasi-9, è in contrasto con i risultati ottenuti sui linfociti dei pazienti nei quali è mostrata una diminuzione dell'espressione insieme ad una alterazione di secrezione di IL-2.

Queste differenze suggeriscono la presenza di altri fattori genetici, nelle famiglie dei pazienti, coinvolti nella genesi di tali difetti di attivazione.

Tuttavia, gli esperimenti condotti in cellule di derivazione tumorale non garantiscono un modello cellulare sovrapponibile a quello “in vivo”. Per questa ragione, sono stati allestiti esperimenti di trasduzione lentivirale al fine di inserire il vettore contenente il cDNA della caspasi-9 mutata all'interno di cellule primarie.

PBMC e i monociti trasdotti con i vettori caspasi-9/GFP e sola GFP hanno mostrato una buona percentuale di fluorescenza 24 ore dopo la trasduzione.

Le analisi dopo 48 ore (PBMC) e sei giorni (monociti), invece, hanno mostrato una elevata mortalità delle cellule trasdotte suggerendo la presenza di variabili (tipo di cellule, numero di particelle virali, uso di agenti per la trasduzione) in grado di influenzare la trasduzione virale.

Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano che i differenti vettori lentivirali presentano una buona efficienza di trasduzione cellulare che porta all'espressione delle proteine codificate dal cDNA contenuto in essi. L'utilizzo di vettori lentivirali, come sistema di trasduzione, permette di studiare la mutazione in caspasi-9 valutando gli effetti a livello cellulare.

I risultati suggeriscono un possibile coinvolgimento della caspasi-9 nella regolazione della proliferazione cellulare con effetti sull'espressione di CD25.

L'utilizzo di un sistema lentivirale permette la trasduzione di cellule primarie al fine di creare un modello cellulare sovrapponibile e più vicino a quello “in vivo”.

I risultati ottenuti mostrano una buona trasduzione delle cellule primarie caratterizzata, tuttavia, da una rapida mortalità cellulare dovuta forse alle condizioni di trasduzione e/o presenza delle particelle di vettore lentivirale.

# PROSPETTIVE FUTURE

Lo scopo di questo lavoro era quello di creare un sistema lentivirale per la trasduzione di linee cellulari tumorali e primarie al fine di indagare l'eventuale correlazione tra la forma mutata di caspasi-9 e la proliferazione cellulare. I risultati ottenuti hanno mostrato l'efficienza di trasduzione dei vettori lentivirali sulle cellule MT2 e sulle cellule primarie (PBMC e monociti).

Tuttavia, la mortalità cellulare riscontrata nella trasduzione virale di PBMC e monociti obbliga a migliorare le condizioni di trasduzione. Questo permetterà di garantire una maggiore sopravvivenza cellulare e indagare gli aspetti del ruolo della caspasi-9 nelle funzioni anti-apoptotiche.

Tali aspetti verranno approfonditi con studi che valuteranno le differenze di secrezione di IL-2 e delle altre citochine nelle cellule trasdotte rispetto alle cellule di controllo. Gli studi valuteranno, anche, le differenze nell'espressione in membrana dei diversi marcatori cellulari.

Inoltre, gli effetti della mutazione sulla proliferazione cellulare saranno approfonditi mediante l'indagine degli eventuali target cellulari della caspasi-9 coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare.

In letteratura alcuni lavori hanno mostrato come deficit funzionali delle caspasi possano influenzare le manifestazioni di ALPS [18] o immunodeficienze [19] che, comunque, mostrano quadri multifattoriali dato che non tutti i soggetti portatori della mutazione sono malati. Un obiettivo sarà quello di valutare quali altri fattori siano presenti nei soggetti affetti e studiare il loro coinvolgimento nello sviluppo di tali malattie.

Definire l'esatto meccanismo molecolare attraverso cui le caspasi possano regolare le funzioni non-apoptotiche permetterà di capire la modulazione della bilancia tra morte cellulare e proliferazione che si instaura in risposta alla stimolazione dei recettori sui linfociti. Questo potrebbe agevolare, in futuro, studi di terapia genica con l'obiettivo di ripristinare la normale funzionalità dei fattori mutati coinvolti nello sviluppo di ALPS o immunodeficienza.

# BIBLIOGRAFIA

---

1. Goldsby R., A., Kindt T., J., Osborne B., A. (2005) *Kuby* **2/e**, 473-521
2. Harrison, Kasper D., L., Longo D. (2005) *Principi di medicina interna* **16/e**, 2147-2245
3. Brenner D., Krammer P., H., Arnold R. (2008) *Oncology Ematology* **66**, 52-64
4. Mateo V., Menager M., Saint-Basile G., Stoizenberg M., C., Roquelaure B., André N., Florkin B., Deist F., Picard C., Fischer A., Rieux-Laucat F. (2007) *Blood* **110**, 4285-4292
5. Dianzani U., Chiocchetti A., Ramenghi U. (2002) *Life Sciences* **72**, 2803-2824
6. Cho S., C., Choi E., J. (2002) *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 24-27
7. Los M., Stroh C., Janicke R., U., Engels I., H., Schulze-Osthoff K. (2001) *Trends in Immunology* **22**, 31-34
8. Launay S., Hermine O., Fontenay M., Kroemer G., Solary E., Garrido C. (2005) *Oncogene* **24**, 5137-5148
9. Desagher S., Osen-Sand A., Montessult S., Magnenat E., Vilbois F., Hochmann A., Journot L., Antonsson B., Martinou J., C. (2001) *Molecular Cell* **8**, 601-611
10. Pop C., Timmer J., Sperandio S., Salvesen G., S. (2006) *Molecular Cell* **22**, 269-275
11. Nishida K., Yamaguchi O., Otsu K. (2008) *Circulation Research* **103**, 343-351
12. Riedl S., J., Salvesen G., S. (2007) *Nature* **8**, 405-413
13. Pop C., Salvesen G., S., (2009) *The Journal of biological chemistry* **284**, 21777-21781
14. D'Agnillo F., Alayash A. (2001) *Blood* **98**, 3315-3323
15. Algeciras-Schimmich A., Barnhart B., C., Peter M., E. (2002) *Current Opinion in Cell Biology* **14**, 721-726
16. Schwerk C., Osthoff K., S. (2003) *Biochemical Pharmacology* **66**, 1453-1458
17. Droin N., Cathelin S., Jacquelin A., Guery L., Garrido C., Fontenay M., Hermine O., Solary E. (2008) *Biochemical Pharmacology* **90**, 416-422
18. Chun H., J., Zheng L., Ahmad M., Wang J., Speirs C., K., Siegel R., M., Dale J., K., Puck J., Davis J., Hail C., G., Skoda-Smith S., Atkinson T., P., Straus S., E., Lenardo M., J. (2002) *Nature* **419**, 395-399
19. Falk M., Ussat S., Reiling N., Wesch D., Kabelitz D., Klages S., A. (2004) *The Journal of Immunology* **173**, 5077-5085
20. Lamkanfi M., Festjens N., Declercq W., Berghe T., V., Vandenabeele P. (2007) *Nature* **14**, 44-55
21. Castedo M., Perfettini J., L., Roumier T., Kroemer G. (2002) *Nature* **9**, 1287-1293
22. Scaffidi C., Volkland J., Blomberg I., Hoffmann I., Krammer P., H., Peter M. (2000) *The American Association of Immunologist* **164**, 1236-1242
23. Park M., A., Li J., T., Hagan J., B., Maddox D., E., Abraham R., S. (2008) *Lancet* **372**, 489-502
24. Hadano S., Nasir J., Nichel K., Rasper D., M., Vaillancourt J., P., Sherer S., W., Beatty B., G., Ikeda J., E., Nicholson D., W., Hayden M., R. (1999) *Mammalian Genome* **10**, 757-76
25. Johnson C., R., Jarvis W., D. (2004) *Apoptosis* **9**, 423-427
26. Shiozaki E., N., Chai J., Rigotti D., J., Riedi S., J., Li P., Srinivasula S., M., Alnemri E., S., Fairman R., Shi Y. (2003) *Molecular Cell* **11**, 519-527
27. Renatus M., Stennicke H., R., Scott F., L., Liddington R., C., Salvesen G., S. (2001) *PNAS* **98**, 14250-14255
28. Wei-Lynn W., Puthalaakath W., H. (2008) *Life* **60**, 390-397
29. Maelfait J., Beyaert R. (2008) *Biochemical Pharmacology* **76**, 1365-1373
30. Pei C., Bonavida B. (2002) *Molecular Cancer Therapeutics* **1**, 1051-1058
31. Frauwirth K., A., Thompson C., B. (2002) *The Journal of Clinical Investigation* **109**, 295-299



32. Ramenghi U., Bonisconi S., Migliaretti G., DeFranco S., Bottarel F., Gambaruto C., DiFranco D., Priori R., Conti F., Dianzani I., Varesini G., Merletti F., Dianzani U. (2000) *Blood* **95**, 3176-3182
33. Rieux-Laucat F., Fischer A., Le Deist F. (2003) *Current Opinion in Immunology* **15**, 325-331
34. Drappa J., Vaishnav A., K., Sullivan K., E., Chu J., L., Elkon K., B. (1996) *The New England Journal of Medicine* **335**, 1643-1649
35. Worth A., Thrasher A., J., Gaspar H., B. (2006) *British Journal of Haematology* **133**, 124-140
36. Rieux-Laucat F., Le Deist F., Fischer A. (2003) *Cell Death and Differentiation* **10**, 124-133
37. Chatinet A., M., Stolzenberg M., C., Loffredo M., S., Shaffner C., Ducrot N., Rieux-laucat F. *Blood* (2009) **113**, 3027-3030
38. Kopecky O., Lukesova S. (2007) *International Journal of Immunogenetics* **34**, 225-229
39. Oliveira J., B., Ridere N., Niemela J., E., Zheng L., Sakai K., Nix C., P., Danner R., L., Barb J., Munson P., J., Puck J., M., Dale J., Straus S., E., Fleisher T., A., Lenardo M., J. (2007) *PNAS* **104**, 8953-8958
40. Holzelova E., Vonarbourg C., Stolzenberg M., Arkwright P., D., Selz F., Prieur A., M., Blanche S., Bartunkova J., Vilmer E., Rieux-Laucat F. *The New England Journal of Medicine* (2004) **351**, 409-418
41. Dianzani U., Bragardo M., DiFranco D., Alliaudi C., Scagni P., Buonfiglio D., Redolgia V., Bonisconi S., Correr A., Dianzani I., Ramenghi U. (1997) *Blood* **89**, 2871-2879
42. Brandt D., Gershwin M., E. (2006) *Autoimmunity Reviews* **5**, 465-470
43. Rigaud S., Fondaneche M., Lambert N., Pasquier B., Mateo V., Soulas P., Galicier L., LeDeist F., Rieux-Laucat F., Revy P., Fischer A., Saint Basile G., Latour S. (2006) *Nature* **444**, 110-114
44. Breckpot K., Dullaers M., Meirvenne S., V., Heirmann C., DeGreef C., Van der Bruggen P., Thielemans K. (2003) *The Journal of Gene Medicine* **5**, 654-667
45. Follenzi A., Naldini L. (2002) *Method in Enzymology* **346**, 454-465
46. Cavalieri S., Cazzaniga S., Geuna M., Magnani Z., Bordignon C., Naldini L., Bovini C. *Blood* (2003) **102**, 497-505
47. DuBridg R., B., Tang P., Hsia H., C., Leong P., M., Miller J., H., Calos M. (1987) *Molecular and Cellular Biology* **7**, 379-387
48. Schneider U., Schweank H., Bornkamm G. (1977) *International Journal of Cancer* **19**, 621-626
49. Beignon A., S., McKenna K., Skoberne M., Manches O., DaSilva I., Kavanagh D., G., Larsson M., Gorelick R., J., Lifson J., D., Bhardwaj N. (2005) *The Journal of Clinical Investigation* **115**, 3265-3275
50. Harman A., N., Wilkinson J., Bye C., R., Bosnjak L., Stern J., L., Nicholle M., Lai J., Cunningham A. (2006) *The Journal of Immunology* **177**, 7103-7113

## **SEMINARI interni al Dipartimento di Scienze Mediche AA 2008-2009**

### Production of biopharmaceuticals in plants

Prof. L. Santi

5/12/08

### Utilizzo delle cellule staminali mesenchimali nelle malattie neurologiche

Prof. A. Uccelli

12/12/08

### La malattia celiaca

Prof. R. Troncone

9/01/09

### Porpora trombocitopenia autoimmune: nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici

Prof. F. Zaja

13/01/09

### Interazioni geni-ambiente nell'eziologia della sclerosi multipla: studi su gemelli

Prof. M. Salvetti

27/01/09

### Non solo motoneuroni: il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica

Prof. A. Musarò

10/2/09

### Ruolo dei polimorfismi dei geni della pigmentazione nell'induzione di mutazioni somatiche nei melanomi

Prof.ssa. G. Bianchi Scarrà

12/2/09

### The use of the cytomegalovirus as a novel vaccine vector for Simian immunodeficiency virus

Prof. Jay A. Nelson

19/2/09

### When a fine tuner of signaling pathway becomes a dangerous amplifier: the case of the proliferase Pin1 in cancer

Prof. G. Del Sal

20/2/09

### Il metabolismo degli endocannabinoidi e la sua rilevanza terapeutica

Prof. M. Maccarone

26/2/09

### La proteomica un nuovo modo di guardare al mondo delle proteine

Prof. P. Pucci

18/3/09

Cellule staminali tumorali implicazioni terapeutiche

Prof. G. Stassi

18/3/09

Le nanotecnologie applicate alla medicina

Prof. Peluso

19/3/09

Regulation of integrin functions in vascular system

Prof. F. Bussolino

26/3/09

Carcinoma differenziato della tiroide: novità nel follow-up e nella terapia

Prof.ssa B. Biondi

2/4/09

I bioreattori nella medicina rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up

Dott.ssa S. Mantero

9/4/09

Patologie dei tumori neuro-cerebrali: recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi

Dott. D. Schiffer

22/4/09

Polycystin-1, the product of the PDK1 gene mutated in Autosomal Dominant Polycystic Disease (ADPKD) is an orphan receptor regulating cell migration and polarity

Dott.ssa A. Boletta

28/4/09

Polarized inflammation in tumor development

Prof. A. Sica

30/4/09

Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo

Prof. A. Columbo

5/5/09

Integrated nanoparticle- biomolecule hybrid system: design of stimuli-responsive nanomaterials for cancer diagnosis and therapy

Dott.ssa B. Palazzo

6/5/09

Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana

Prof. G. Poli

12/5/09

Neutotossicità delle proteine misfolded nelle malattie del motoneurone

Prof. A. Poletti

12/5/09

Functional genomics of brain

Prof. S. Gustincich

13/5/09

Marcatori molecolari nel carcinoma coloretale: dalla terapia alla pratica clinica

Prof. M. Frattini

10/6/09

Il lupus eritematoso cutaneo: quadro clinico e immunopatologico

Prof. E. Berti

6/7/09

ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA:

- Journal Club interni al dipartimento

PARTECIPAZIONE CONGRESSI:

- Workshops Società Italiana Immunologia, Immunologia Clinica e Allergologia (SIICA)  
*How advanced immunology can contribute to new vaccine generations*  
Certosa di Pontignano (Siena)-October 16-18, 2009