

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



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare**

Ciclo XXIV

**Caratterizzazione di due mutazioni identificate
nel gene di Munc13-4 in un paziente affetto
da Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS)**

RESPONSABILE

Prof. Dianzani Umberto

CANDIDATO

Melensi Matteo

INDICE

Introduzione	Pag 4
Materiali e Metodi	Pag 22
Risultati	Pag 25
Discussione	Pag 34
Prospettive future	Pag 39
Bibliografia	Pag 40

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 [1]. 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 α e/o linfofossina che legano i rispettivi recettori innescando la morte cellulare.

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 [2-3]) 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) [4].

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 cellulari.

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 [5].

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 [6]. In seguito a clivaggio, la caspasi-9 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.

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. 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 [7].

Autoimmunità

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 [1].

L'attivazione è accompagnata dalla regolazione di specifici geni per molecole di superficie coinvolte nella proliferazione (CD25) e nelle funzioni effettrici dei linfociti [2].

L'attivazione, inoltre, stimola l'espressione di specifiche molecole coinvolte nel processo di spegnimento del sistema immunitario che induce apoptosi dei linfociti effettori. 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 [2].

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 [2].

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 (emocitopenie autoimmuni, lupus eritematoso sistemico) oppure da cellule (diabete mellito di tipo 1, sclerosi multipla).

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 [2]. 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.

Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS)

Il processo di spegnimento del sistema immunitario è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi numerica dei linfociti e della tolleranza periferica [8-9]. 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⁻CD8⁻ (DN) e manifestazioni autoimmuni; i topi *gld* sono caratterizzati da linfoproliferazione (in assenza di DN e splenomegalia) e Lupus Eritematoso (LES) [10-11].

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) [11-12-13]. 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 [11].

Il gene umano TNFRSF6 è presente sul tratto cromosomico 10q24.1, consiste di 9 esoni e 8 introni [13] 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 [14].

Alcuni pazienti ALPS presentano una mutazione eterozigote in questo gene e, attualmente, sono state descritte settanta mutazioni differenti con penetrazione clinica variabile [13].

Una caratteristica comune a tutte le mutazioni è un difetto nell'apoptosi indotta da Fas [10-13-15].

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 [16-17]:

* pazienti ALPS-0 omozigoti per Fas [15-17] 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) [15].

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) [10] 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) [15-18]. 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) [13] 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 NRAS¹ con riduzione di fattori pro-apoptotici (ALPS-IV) [19]. 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 [12];

*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 [20].

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).

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 [2-10-21].

¹ 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 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 [13].

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

La sindrome emofagocitica

La sindrome emofagocitica (HS) è una malattia caratterizzata da infiammazione multi-sistemica, infiltrazione di linfociti CD8⁺T e difetto nel processo di secrezione dei granuli citotossici.

La HS comprende tre differenti condizioni causate da mutazioni su tre diversi geni.

La prima condizione è la *sindrome di Griscelli* (OMIM#667624), rara malattia autosomica recessiva, causata da mutazioni nei geni codificanti per la proteina Rab27a (RAB27A) e per la miosina-5a (MYO-VA) [22].

I geni RAB27A e MYO-VA mappano sulla regione cromosomica 15q21 e codificano per effettori chiave del trasporto vescicolare intracellulare. La sindrome è caratterizzata da ipopigmentazione della cute e dei capelli e dall'accumulo di melanosomi maturi nei melanociti. I pazienti con mutazioni nel gene RAB27A associano all'albinismo parziale un difetto dei linfociti CTL e la sindrome linfocitocitosi emofagocitica (HLH) con attivazione incontrollata dei macrofagi e dei linfociti CTL. Al contrario, pazienti con difetti della miosina-5a associano all'ipopigmentazione un deterioramento neurologico primitivo, precoce e grave, senza anomalie immunologiche.

Il difetto citotossico conseguente alle mutazioni di RAB27a è responsabile dello scatenamento della fase accelerata, spesso fatale, che può essere trattata solo con il trapianto di midollo osseo [23].

La seconda condizione è la *sindrome di Chediak-Higashi* (OMIM#214500), malattia genetica rara a trasmissione autosomica recessiva caratterizzata da albinismo parziale, anomalie neurologiche multiple, presenza di granuli citoplasmatici anomali nei neutrofili. La principale manifestazione clinica è la suscettibilità alle infezioni batteriche dovuta alle anomalie dell'attività microbica dei neutrofili e monociti. La malattia è causata dalla mutazione del gene *LYST* che codifica per una proteina coinvolta nella regolazione del movimento lisosomiale e funzione citotossica dei granulociti-neutrofili. Un'altra caratteristica della sindrome è la comparsa di una fase accelerata caratterizzata da una malattia linfoproliferativa che può portare al decesso durante la seconda o terza decade di vita. La terapia comprende antibiotici, fattori di crescita, trapianto di midollo e chemioterapia.

L'ultima condizione è la *sindrome linfoistiocitosi emofagocitica* (HLH) che include un gruppo di disordini di tipo familiare (linfoistiocitosi emofagocitica familiare FHL) e acquisito (sHLH).

Le forme familiari sono sindromi autosomiche recessive mentre le forme secondarie sono associate a infezioni, malattie autoimmuni, neoplasie e può colpire in tutte le età compresa quella adulta.

La FHL (OMIM#267700) è una malattia genetica eterogenea che insorge nel primo anno di vita.

I geni coinvolti nello sviluppo della malattia sono il gene *PRF1* codificante la proteina perforina [24] e il gene *UNC13D* codificante la proteina Munc13-4.

Perforina è una componente essenziale nel processo di citotossicità mediata da granuli; alcuni studi hanno mostrato che difetti nel gene *PRF1* conducono alla sindrome FHL di tipo 2 (FLH2) sottotipo della sindrome HLH. Le mutazioni, a carico del gene *PRF1*, presenti nei pazienti affetti da FLH2 determinano un difetto nel ripiegamento della proteina o nel processo di secrezione dei granuli impedendo il normale processo di esocitosi.

Le mutazioni nel gene *UNC13D*, invece, possono causare un deficit della proteina Munc13-4 essenziale per l'attivazione e fusione dei granuli con la membrana [25]. Questo deficit porta ad una minore secrezione di perforina e conduce alla FLH di tipo 3 (FLH3). In letteratura sono conosciuti altri disordini genetici che possono condurre alla manifestazione della malattia (Sintaxina-11 per FLH di tipo 4 e Munc18-2 per FLH di tipo 5) [26].

La malattia è caratterizzata da febbre, epatosplenomegalia, citopenia e disordini del sistema nervoso centrale. I pazienti mostrano anche un accumulo di macrofagi e linfociti CTL a causa del deficit dei meccanismi di innesco della apoptosi.

La sindrome conduce, anche, a bassi livelli di fibrinogeno e alti livelli di ferritina, trigliceridi e della α -catena dell'interleuchina-2 (CD25). La malattia è fatale in poche settimane e in molti casi un trattamento con corticosteroidi, ciclosporina, etoposide risulta in un controllo transiente della malattia. Nei pazienti che non rispondono a questa terapia, oltre che in quelli affetti dalle forme ereditarie, il trapianto di cellule staminali è il solo trattamento potenzialmente guaritivo.

Sinapsi Immunologica

I linfociti CTL e le cellule NK hanno la capacità di eliminare le cellule infettate da virus o cellule tumorali attraverso il rilascio del contenuto dei loro granuli citotossici. I linfociti naive CD8⁺T, dopo aver riconosciuto l'antigene, richiedono 5-8 giorni per differenziare in linfociti CTL, proliferare e migrare verso le cellule target. Durante il differenziamento, granzimi e perforina sono sintetizzati e accumulati all'interno dei granuli citotossici. In seguito, i linfociti CTL riconoscono la cellula target e in 20-30 minuti la uccidono.

Il legame del linfocita CTL con la cellula target conduce ad una riorganizzazione delle proteine di superficie, proteine di segnale intracellulare e proteine del citoscheletro; questo processo conduce alla formazione di una struttura chiamata sinapsi immunologica.

La sinapsi immunologica è caratterizzata da quattro diverse fasi: riconoscimento della cellula target, adesione e formazione di una sinapsi tra le due cellule, orientamento del complesso del Golgi e del centro di organizzazione microtubulare (MTOC) e polarizzazione dei granuli litici verso la cellula bersaglio [26].

In seguito al riconoscimento della cellula bersaglio, i linfociti CTL formano una interazione tra il TCR e MHC⁺peptide della cellula bersaglio al fine di creare una giunzione stabile; questo legame determina un riarrangiamento delle molecole di membrana che porta alla formazione di due aree concentriche: cSMAC (central supramolecular activation complex) ricca di TCR, MHC⁺peptide, recettori accessori CD4/CD8/CD28 e pSMAC (peripheral supramolecular activation complex SMAC) costituito da un anello ricco di integrine (ICAM) e proteine di membrana associate al citoscheletro. I linfociti CTL orientano il MTOC verso il sito di contatto permettendo ai granuli citotossici, ancorati ai microtubuli, di migrare verso la sinapsi immunologica. I granuli sono organelli impiegati da molte cellule per mediare la secrezione di diverse sostanze. Esempio, i linfociti CTL secernono granuli contenenti granzimi e perforina, le mastcellule rilasciano istamina e serotonina mentre le cellule basofili utilizzano i granuli per il rilascio di istamina e altre sostanze [25-27-28-29-30].

I granuli presentano una struttura multi-vescicolare che ha origine dalla progressiva invaginazione della membrana plasmatica di endosomi primari; questi ultimi, in seguito, maturano in endosomi tardivi. La presenza di uno stimolo di attivazione conduce alla maturazione dei granuli litici mediante l'unione di lisosomi ed endosomi tardivi [26].

Il trasporto dei granuli citotossici alla sinapsi immunologica è dipendente dal complesso dei microtubuli presenti nel citoscheletro. I granuli si spostano lungo i microtubuli del MTOC, orientato verso il sito di contatto linfocita CTL-cellula target, fino al centro pSMAC. L'attivazione di proteine segnale, in seguito alla stimolazione del recettore TCR, è fondamentale per l'attivazione

della fosfolipasi- $C\gamma$ (PLC γ) che permette l'orientamento del MTOC e il movimento dei granuli secretori verso la sinapsi immunologica [26]. La produzione di Inositolo-1,4,5-trifosfato (IP₃) da parte della PLC γ conduce alla fuoriuscita di calcio (Ca²⁺) intracellulare verso il citoplasma. La polarizzazione del MTOC è mediato dal diacilglicerolo (DAG) in maniera Ca²⁺-indipendente mentre il movimento dei granuli è mediata dal Ca²⁺.

In seguito, i granuli dal centro pSMAC si spostano verso l'area cSMAC per secernere il loro contenuto. Il rilascio di perforina, contenuta nei granuli citotossici, induce la formazione di pori e l'entrata di granzimi nel citoplasma della cellula target; i granzimi agiscono su specifici substrati e iniziano la morte per apoptosi della cellula bersaglio.

Proteine Rab

Negli ultimi anni, sono state identificate le molecole coinvolte nel processo di secrezione dei granuli. Le proteine Rab GTPasi sono coinvolte nella regolazione della formazione, motilità e fusione delle vescicole alla membrana plasmatica.

Le Rab GTPasi appartengono alla grande famiglia delle piccole GTPasi all'interno della superfamiglia Ras. Le proteine Rab possono essere legate a GTP e alla membrana (stato attivo) o a GDP e trovarsi nel citoplasma (stato inattivo). Il passaggio ciclico tra attivo/inattivo è controllato da enzimi regolatori GEF (nucleotide exchange factor) e GAP (GTPase-activating protein) [29-31].

Il numero delle isoforme di Rab varia tra specie e specie; nell'uomo e nel topo esistono 60 diverse isoforme. Il numero elevato di isoforme ha causato molti problemi nell'individuare le isoforme specifiche coinvolte nelle fasi del trasporto vescicolare [32].

La proteina Rab3 è stata la prima isoforma di Rab ad essere associata al processo di regolazione di esocitosi dei granuli nelle cellule neuronali ed endocrine [31]. Recentemente, studi di proteomica hanno evidenziato sulle membrane delle vescicole secretorie la presenza di un'altra isoforma di Rab (Rab27) coinvolta in questo processo [29-33].

Alcune forme di Rab sono presenti sulla membrana delle vescicole; tuttavia, la maggior parte di esse appartengono a vescicole immature provenienti dall'apparato di Golgi o dagli endosomi e quindi non sono coinvolte nel processo di esocitosi [32]. Ogni proteina Rab ha una precisa distribuzione cellulare che permette di identificare l'organizzazione di membrana e le caratteristiche delle vescicole [32]. Per esempio, Rab4 e Rab5 sono localizzate sugli endosomi primari, Rab7 sugli endosomi tardivi [32].

Le proteine Rab26 e Rab37 sono espresse sulle vescicole di cellule tessuto-specifiche (Rab26 nelle cellule della parotide, Rab37 nelle cellule pancreatiche e nei mastociti); le sottofamiglie Rab3 e Rab27 sono espresse sulla membrana delle vescicole delle cellule neuronali, cellule

endocrine/esocrine e cellule del sistema immunitario (linfociti CTL, cellule NK e cellule mastocitarie) [32-33].

Le isoforme Rab3a e Rab27a sono coinvolte nel controllo della fase di ancoraggio delle vescicole alla membrana plasmatica piuttosto che nella fase di fusione [29]. Rab27a regola l'esocitosi dei granuli basofili nei mastociti, dei granuli citotossici nei linfociti CTL e dei granuli densi nelle piastrine [33].

Uno studio ha mostrato che il silenziamento della proteina Rab3a (o Rab27a) riduce il numero di vescicole ancorate alla membrana plasmatica e la forma attiva Rab27a (o Rab3a), inoltre, non è in grado di compensare la funzione della proteina mancante. Il silenziamento di entrambe le isoforme conduce ad una maggiore riduzione di vescicole rispetto al singolo silenziamento; questo risultato suggerisce una co-operazione di Rab3a e Rab27a nel processo di esocitosi [29-30].

Tuttavia, le proteine Rab3a e Rab27a possono essere co-espresse sulle membrane delle vescicole delle cellule neuronali, cellule β del pancreas, melanociti e svolgere una differente funzione sul processo di secrezione [28].

Alcuni studi hanno mostrato che la maggiore espressione di Rab3a e Rab27a in varie linee cellulari inibisce il processo di secrezione sebbene le proteine Rab sono promotori positivi del trasporto vescicolare [30-34].

I legami tra le proteine Rab e le proteine SNARE sono importanti per l'ancoraggio e la fusione delle vescicole alla membrana plasmatica. Diversi studi hanno identificato proteine effettrici che possono legare direttamente o indirettamente le proteine SNARE per formare un complesso proteico tra vescicola e membrana plasmatica.

Proteine SNARE

L'azione delle proteine Rab e delle loro proteine effettrici è importante per il processo di fusione delle vescicole alla membrana plasmatica. Questo processo richiede la presenza di altre proteine appartenenti alla famiglia delle proteine SNARE (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors) [35].

L'interazione di una proteina SNARE espressa sulla membrana delle vescicole (v-SNARE) con una proteina SNARE espressa sulla membrana plasmatica (t-SNARE, comprende una catena leggera e due catene leggere) porta alla formazione di un complesso trans-SNARE. Il complesso è costituito da un fascio di quattro eliche (una elica v-SNARE e tre t-SNARE) che interagiscono in modo idrofobico [34]. In seguito alla fusione (mediata dalle proteine Rab e SNARE) delle vescicole con la membrana plasmatica, il complesso trans-SNARE diventa cis-SNARE con il distacco delle proteine v-SNARE e t-SNARE. Questo distacco è promosso dall'azione del fattore NSF (N-

ethylmaleimide-sensitive factor) e α -SNAP (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein) [34].

Le proteine VAMP sono le principali proteine v-SNARE coinvolte nel processo di fusione delle vescicole. Esistono sette forme diverse, VAMP7 (espressa su endosomi tardivi e lisosomi) è importante durante il processo di esocitosi dei granuli litici [34].

I membri della sottofamiglia SNAP (SNAP23, SNAP25, SNAP29: synaptosome-associated protein) appartengono alle proteine con catena leggera t-SNARE; la famiglia delle proteine Syntaxina costituiscono le catene pesanti t-SNARE [29-34].

Proteine effettrici

Le proteine Rab3a e Rab27a regolano la fase di ancoraggio delle vescicole alla membrana plasmatica. La co-operazione delle proteine Rab è promossa dalla capacità delle proteine effettrici di interagire sia con Rab3a che Rab27a.

Le proteine esofiline (exocytosis-associated rabphilin3/granophilin-like proteins) e Noc-2, individuate come molecole effettrici per Rab3a, possono legare Rab27a; Slp (synaptotagmin-like proteins) e Slac2 (Slp homologue lacking C2-domains), effettori per Rab27a, interagiscono con Rab3a [36-37].

Tutte le molecole effettrici che legano Rab3/Rab27 presentano, all'N-terminale, un dominio RBD (Rab-binding domain) con ripetizioni di residui di zinco e cisteine [37].

Al C-terminale, le proteine effettrici hanno due domini C₂ che permettono il legame con i fosfolipidi di membrana durante le fasi del processo di secrezione [37].

Le proteine effettrici legano contemporaneamente le proteine Rab sulla vescicola secretoria e le proteine della membrana plasmatica favorendo la fase di ancoraggio [29].

Slp4

La proteina effettrice Slp4 presenta due domini C₂ ed è espressa nelle cellule β del pancreas.

Slp4 interagisce, mediante il dominio RBD, con Rab27a e Rab3a [37]. Durante il processo di esocitosi, Slp4 lega Rab27a presente sui granuli secretori e favorisce il legame alla membrana plasmatica attraverso l'interazione con syntaxina-1 (componente delle proteine SNARE di membrana) e Munc18-1 in membrana [37].

Slac2, rabfilina3

Le proteine Slac2 e rabfilina3 prendono il nome di melanofiline in quanto proteine effettrici espresse nei melanociti.

Le proteine presentano, all’N-terminale, il dominio RBD per Rab27a/Rab3a ma nessun dominio C₂ al C-terminale che, invece, presenta un dominio “coil” in grado di interagire con la miosina-Va [37]. Le melanofiline legano Rab27a sui melanosomi e la miosina-Va sui filamenti di actina portando alla formazione di un complesso proteico che sarà trasportato ai cheratinociti adiacenti [37].

Alcuni studi hanno mostrato che la maggiore espressione degli effettori di Rab3a o Rab27a può modulare il processo di esocitosi nelle cellule endocrine; l’aumento di espressione di Slp4 e Slac2 può inibire l’esocitosi delle vescicole mentre altri membri della famiglia di Slp promuovono la fuoriuscita del contenuto delle vescicole [38-39].

Recentemente, alcuni studi hanno identificato la proteina Munc13-4 come ulteriore effettore della proteina Rab27a [25-30-33].

Proteine Munc13

Le proteine Munc13 sono una famiglia di tre proteine (Munc13-1, Munc13-2, Munc13-3) con omologia alla proteina Unc-13p di *Caenorhabditis elegans*.

Le proteine della famiglia Munc13 contengono un dominio C1 (capace di legare l’estere del forbolo), due domini C2 (capace di legare calcio e fosfolipidi) e due domini MHD (Munc13-homology-domains) [25].

L’isoforma Munc13-2 è espressa in modo ubiquitario nell’organismo mentre le altre proteine della famiglia Munc13 sono espresse soltanto nel cervello. Munc13-1 è presente in tutti i neuroni e svolge un ruolo nell’attivazione dell’esocitosi delle vescicole sinaptiche, Munc13-3 è espresso nella regione del cervelletto e controlla il rilascio dei neurotrasmettitori [40].

Le proteine della famiglia Munc13 regolano, durante il processo di esocitosi, la formazione di un complesso proteico (complesso trans-SNARE) tra la membrana delle vescicole secretorie e la membrana plasmatica. Per molti anni sono state ricercate proteine, simili alle proteine Munc13, coinvolte nella regolazione dei processi secretori in cellule di tipo non-neuronale. Uno studio [25] ha identificato e caratterizzato una molecola (Munc13-4) appartenente alla sottofamiglia delle molecole Munc13.

Munc13-4

Il gene UNC13D presente sul tratto cromosomico 17q25 è lungo 17 kb (32 esoni) e codifica per la proteina Munc13-4 costituita da 1088 aminoacidi.

La proteina è formata da due domini MHD e C2 ma non presenta il dominio C1:

MHD (Munc13 Homology Domains, X⁵⁵⁷-X⁶⁷⁷ per MHD1 e X⁷⁸⁸-X⁸⁹⁴ per MHD2) costituito da α -eliche con lunghezze e ripetizioni aminoacidiche diverse. Il dominio è essenziale per la localizzazione specifica della proteina [25]

C2 DOMAIN (X¹⁰⁹-X²⁸⁴ per C2A e X⁹⁰⁴-X¹⁰⁴⁷ per C2B) contiene cinque residui di acido aspartico che formano un sito per gli ioni Ca²⁺ che mediano il legame con i fosfolipidi di membrana dipendenti dal calcio. La presenza di una α -elica nel loop-3 del dominio C2A, invece, permette il legame con la membrana plasmatica senza la presenza del calcio [25]



Figura 1

Diagramma della proteina effettrice Munc13-4

Il diagramma mostra i quattro domini della proteina Munc13-4: due domini MHD e due domini C2.

La proteina Munc13-4 è espressa, soprattutto, nelle cellule del tessuto bronchiale, nella milza, nelle cellule dell'apparato riproduttore e nei linfociti CTL; in forma minore nel tessuto muscolare cardiaco, fegato, rene, cervello e muscolo scheletrico [25-30].

Tuttavia, l'espressione di Munc13-4 non è limitata ai linfociti CTL ma è presente anche in altre cellule ematopoietiche come piastrine, mastcellule e cellule NK. In particolare, nelle piastrine, Munc13-4 è distribuita tra citoplasma e membrana plasmatica ma non è associata con i granuli densi [27]; nelle mastcellule, Munc13-4 è espressa sulla membrana dei lisosomi [41]. Nelle cellule NK, la proteina è espressa sulla membrana dei granuli litici [34].

Munc13-4 conferisce alle vescicole ancorate alla membrana plasmatica uno stato competente alla fusione necessario prima del processo di secrezione [42].

La mutazione della forma Munc13-4 causa una perdita della funzione della proteina che impedisce l'esocitosi dei granuli litici durante la fase della sinapsi immunologica. Questo deficit conduce alla sindrome FLH di tipo 3 [25].

Munc13-4 interagisce con la proteina Rab27a/GTP formando un complesso che agisce durante la fase di fusione vescicola-membrana plasmatica [30]. La regione compresa tra gli aminoacidi X²⁴⁰-X⁵⁴³ è necessaria per il legame con la proteina Rab27a [30].

Pazienti affetti da FLH3 mostrano un normale ancoraggio delle vescicole alla membrana plasmatica ma un difetto nella fusione e nel rilascio del loro contenuto [30].

La proteina Munc13-4 è importante nella regolazione della secrezione del contenuto dei granuli citotossici ma non è coinvolta nei processi di secrezione citochinica da parte dei linfociti [30].

La proteina è coinvolta, anche, nella secrezione dei lisosomi nelle mastcellule e dei granuli densi nelle piastrine [25-30].

Uno studio descrive la capacità della proteina Munc13-4 di favorire l'associazione di endosomi di riciclo (che esprimono Rab11) con endosomi tardivi (che esprimono Rab7 e Rab27a) per formare vescicole dette esocitiche. Queste vescicole, in seguito ad uno stimolo di attivazione, si uniscono a lisosomi e portano alla formazione di granuli litici maturi [26-42]. Questo modello è in contrasto con uno studio che afferma l'associazione costitutiva di Rab27a e Munc13-4 sulle membrana dei lisosomi [42].

Il processo di secrezione

Il processo di secrezione del contenuto delle vescicole è costituito da diverse fasi: reclutamento delle vescicole secretorie verso la sinapsi immunologica e ancoraggio alla membrana plasmatica, attivazione e fusione delle vescicole, secrezione del contenuto delle vescicole.

Le Rab GTPasi sono i regolatori principali della formazione, motilità e fusione delle vescicole. In seguito ad una stimolo di attivazione (esempio il legame del TCR con MHC⁺peptide), i lisosomi uniti a endosomi tardivi portano alla formazione di granuli litici maturi che polarizzano verso la sinapsi immunologica [26].

Lo stimolo di attivazione permette il passaggio dalla forma inattiva RabGDP alla forma attiva RabGTP promosso dal fattore GEF [31-32]. RabGTP interagisce con specifiche proteine effettrici che permettono il legame con le proteine della membrana plasmatica (fase di ancoraggio). Per esempio, nei linfociti CTL la proteina Rab27aGTP lega la proteina effettrice Slp1/2 che permette il legame con le proteine di membrana SNAP23 [26-31].

Dopo l'ancoraggio dei granuli alla membrana plasmatica, una ulteriore fase (attivazione) è necessaria per rendere le vescicole competenti alla fusione con la membrana plasmatica.

La proteina Munc13-4 è coinvolta in questa fase. Munc13-4 lega il complesso syntaxina-11/Munc18-2 sulla membrana plasmatica e ne promuove il passaggio alla conformazione attiva. Questo cambiamento promuove la formazione di una struttura a fascio composta da RabGTP/Slp2_t-SNARE (SNAP23, syntaxina-11/Munc18-2)_v-SNARE (VAMP7) [26].

La mancanza di syntaxina-11 impedisce parzialmente l'esocitosi dei granuli delle cellule NK e dei linfociti CTL e causa la FLH di tipo 4 [26]. Mutazioni nel gene codificante per Munc18-2 conduce alla sindrome FLH di tipo 5 [26].

Il complesso syntaxina-11/Munc18-2, probabilmente, regola l'ancoraggio dei granuli e la formazione iniziale del complesso SNARE prima dell'inizio della fase di attivazione [26].

In seguito alla fusione dei granuli alla membrana plasmatica, i granuli liberano il loro contenuto.

Un ruolo importante è svolto dall'acido sfingomielinasi (ASMasi) che permette il movimento dei lipidi di membrana e la conseguente esocitosi del contenuto dei granuli.

Le proteine della famiglia Rab27, Munc13, SNARE sono coinvolte nel processo di esocitosi dei granuli litici nei linfociti CTL; questo suggerisce un modello applicabile al trasporto vescicolare in altri tipi cellulari [27-30-33].

Identificazione di due variazioni nucleotidiche nel gene UNC13D in un paziente ALPS-I

I pazienti con ALPS e quelli con FHL hanno in comune un quadro linfoproliferativo ed una maggior suscettibilità allo sviluppo di linfoma. Inoltre, alla base di entrambe le patologie, vi sono mutazioni in geni coinvolti nel processo di citotossicità cellulo-mediata, rispettivamente Fas e perforina.

Un lavoro svolto nel nostro laboratorio ha dimostrato che alcune variazioni del gene di perforina possono favorire lo sviluppo di ALPS/DALD [46]. Inoltre negli ultimi anni, studi condotti su pazienti affetti da FHL hanno identificato variazioni nel gene di Munc13-4 coinvolte nel deficit di secrezione di perforina [25]. Questi studi hanno suggerito che la proteina Munc13-4 potesse essere un ulteriore fattore coinvolto nello sviluppo del ALPS.

Al fine di valutare un coinvolgimento della proteina Munc13-4 nello sviluppo del ALPS/DALD, sono state ricercate variazioni nucleotidiche nel gene UNC13D. Il sequenziamento del gene è stato compiuto in 22 pazienti affetti da ALPS o DALD. In 9 pazienti, sono state identificate dieci variazioni in eterozigosi in grado di determinare un cambio aminoacidico a livello della proteina. Nessuna variazione era presente nei 100 soggetti di controllo. Quattro variazioni erano già state descritte in pazienti affetti da FHL3 (A59T, R928P, R928C, 753+1G) [43-47]; le altre sei variazioni, invece, non erano mai state identificate (C112S, L253C, V781I, I848L, S923C, A995P). L'analisi informatica con il software Polyphen² ha mostrato che quattro variazioni (C112S, V781I, I848L, A995P) non erano in grado di alterare la funzione della proteina Munc13-4 a differenze delle variazioni L253C e S923C.

Queste variazioni sono state identificate in eterozigosi in un paziente affetto da ALPS-I. e sono presenti sullo stesso allele; il sequenziamento del Dna dei genitori ha mostrato che le due mutazioni sono ereditate entrambe dalla madre. La variazione L253C è stata individuata in posizione +757(C/G) sul cDNA del gene UNC13D, nel frammento codificato dall'esone-10; la variazione S923C è stata individuata in posizione +2768(C/G) nel frammento codificato dall'esone-29. Il paziente presentava, anche, una mutazione in eterozigosi nel gene di Fas e nel gene di Xiap, entrambe ereditate dalla madre.

² <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>

Scopo del lavoro

Scopo del mio lavoro è stato quello di caratterizzare le mutazioni riscontrate nel gene di Munc13-4 e valutarne gli effetti a livello cellulare e molecolare concentrandomi sulle eventuali alterazioni a livello del processo di esocitosi.

Inoltre precedenti lavori, condotti su linfociti CTL, piastrine, cellule NK e mastcellule [27-30-42], hanno mostrato la capacità della proteina Munc13-4 di interagire con Rab27a. Munc13-4 svolge, anche, un ruolo importante nel controllo della fusione delle vescicole con la membrana plasmatica. Sulla base di questi lavori, si è cercato di individuare alterazioni nell'espressione, nell'attività della proteina e nei meccanismi di migrazione-fusione delle vescicole con la membrana plasmatica al fine di chiarire il ruolo della proteina Munc13-4 nello sviluppo del ALPS.

MATERIALI E METODI

Sequenziamento gene *UNC13D*

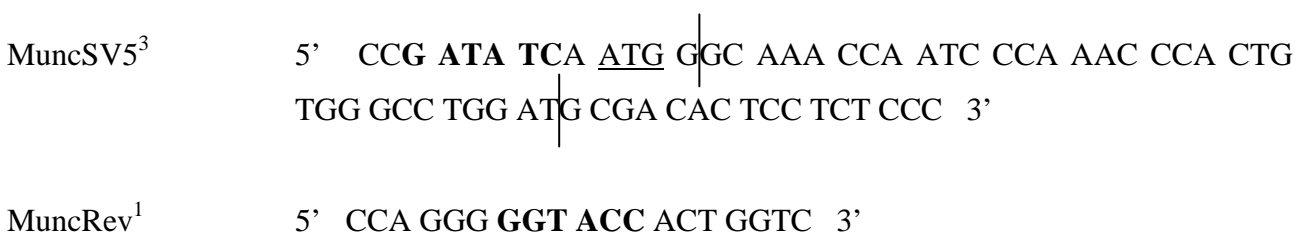
Le sequenze genomiche del gene *UNC13D*, codificante per la proteina Munc13-4, sono state ottenute dal “National Center for Biotechnology Information”. Il DNA genomico è stato estratto da campioni di sangue ottenuti da pazienti ALPS, dai familiari e controlli sani. Per analizzare il gene *UNC13D*, esoni e regioni introniche adiacenti sono state sequenziate con il kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v1.1 (Applied Biosistem, CA, Usa). Le sequenze ottenute sono state analizzate mediante il software Sequence Analysis.

Plasmidi

La forma wild-type della proteina Munc13-4 è stata clonata nel plasmide pcDNA3.1 (Invitrogen, san Diego, CA). Le forme mutate, generate mediante PCR, sono state clonate nel plasmide pcDNA3.1/MycA (Invitrogen). Il tag Sv5 (Simian-Virus 5) è stato inserito all N-terminale del cDNA delle forme wild-type e mutate mentre il tag Myc è stato inserito al C-terminale delle sole forme mutate.

Clonaggio della forma wild-type e mutata di *Munc13-4*

Il plasmide pOTB7 contenente il cDNA wild-type di Munc13-4 (ImaGenes, Germania) è stato usato come stampo per il clonaggio della forma wild-type nel plasmide pcDNA3.1. Il clonaggio è stato effettuato con un oligonucleotide forward (addizionato dell’epitopo Sv5) ed un oligonucleotide reverse. Le due forme mutate della proteina Munc13-4 (C757G, C2768G) sono state clonate, singolarmente e insieme, nel plasmide pcDNA3.1/MycA. La mutagenesi sito specifica del cDNA di Munc13-4 è stata ottenuta, tramite PCR, con primers contenenti le mutazioni nelle posizioni determinate. I clonaggi sono stati confermati con il sequenziamento del cDNA di Munc13-4 inserito nei plasmidi.



³ In grassetto sono evidenziati i siti di restrizione, le barre delimitano gli epitopi mentre l’ATG è sottolineato

Trasfezione in cellule 293T e HMC-1

Cellule HMC-1⁴ sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Gibco, New York, Usa) addizionato di 10 mM HEPES, 1% L-Glutamina, 1X Antibiotici (Penicillina, Streptomina, Gentamicina), 10% FBS e incubate a 37°C in atmosfera umidificata.

Le cellule 293T⁵ sono state coltivate in DMEM (Gibco, New York, Usa) addizionato di 1X antibiotici, 10% FBS e incubate a 37°C in atmosfera umidificata.

Le cellule HMC-1 e le cellule 293T sono state trasfettate utilizzando il kit Lipofectamina-2000 (Invitrogen, San Diego, CA). Le trasfezioni sono state effettuate con il plasmide pcDNA3.1/Munc13-4 wild-type, pcDNA3.1/MycA/Munc13-4 C757G, pcDNA3.1/MycA/Munc13-4 C2768G, pcDNA3.1/MycA/Munc13-4 C757G+C2768G.

L'avvenuta trasfezione, dopo 48 ore, è stata valutata al microscopio a fluorescenza con un plasmide di controllo contenente la proteina GFP (Green Fluorescent Protein).

Saggio di degranolazione

Cellule HMC-1 trasfettate sono state centrifugate e il pellet è stato risospeso in PBS contenente 1.6mM CaCl₂. Dopo una incubazione per 5 minuti a 37°C, le cellule sono state stimulate con 10⁻⁷ M fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 37°C per 10 minuti o incubate in assenza di stimolo. L'incubazione è stata bloccata centrifugando la sospensione per 1 minuto a 4°C. Per monitorare l'esocitosi dei granuli primari, è stata valutata dell'espressione del marcatore di superficie CD63 [41].

L'immunofluorescenza è stata visualizzata con un anticorpo α -CD63 coniugato FITC (isotiocianato di fluoresceina) (Biolegend, San Diego, CA) dopo Fix&Perm (Invitrogen).

Western Blotting

Cellule 293T e cellule HMC-1 trasfettate sono state lisate in un buffer di lisi (50 mM Tris-HCl pH=8, 1% Triton, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂) [43] contenente inibitori di proteasi (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, PMSF). I campioni ottenuti sono stati caricati su gel 8% SDS-PAGE ad una concentrazione di 150 μ g. Le proteine sono state analizzate con mAb α -Sv5, mAb α -myc (Santa Cruz, CA, Usa) e mAb α -Rab27a (Santa Cruz). Per la rivelazione degli anticorpi primari sono stati utilizzati mAb α -mouse coniugati ad HRP (Sigma-Aldrich).

Analisi statistica

I valori p value sono stati ottenuti impiegando il test Mann Whitney ($p < 0.05$).

⁴ Linea cellulare umana di mastcellule immature [44]

⁵ Cellule umane di epitelio renale embrionale [45]

RISULTATI

Le forme mutate C2768G e C757G+C2768G mostrano una maggiore espressione di Munc13-4 rispetto alla forma wild-type

Le mutazioni C757G e C2768G, riscontrate in un paziente affetto da ALPS-I, sono state identificate sul gene UNC13D codificante per la proteina Munc13-4.

Per verificare gli effetti delle mutazioni, ci siamo trasferiti in un sistema eterologo, che esprimesse bassi livelli di Munc13-4 endogena, e abbiamo selezionato le cellule 293T. Abbiamo clonato il cDNA codificante per le forme mutate (C757G, C2768G, C757G+C2768G) e per la forma wild-type mediante PCR a partire da cDNA stampo contenuto nel plasmide pOTB7 (materiali e metodi). I costrutti sono stati trasfettati transientemente in cellule 293T e, dopo 48 ore, è stata valutata l'espressione delle diverse forme in western blotting. Come mostrato in figura 2A, l'anticorpo α -Sv5 riconosceva una banda specifica a 120kDa che corrispondeva all'espressione della proteina Munc13-4. Le forme mutate C757G e C2768G mostravano una maggiore espressione della proteina rispetto alla forma wild-type (Figura 2A-2B). La trasfezione del costrutto contenente il cDNA con la doppia mutazione (C757G+C2768G), mostrava un livello di espressione intermedio a quelli ottenuti con la trasfezione delle singole mutazioni (Figura 2A-2B). Anche in questo caso, comunque, l'espressione della forma C757G+C2768G era superiore a quello della forma wild-type (Figura 2A-2B).

I dati ottenuti hanno dimostrato che la mutazione C2768G era in grado di aumentare l'espressione della proteina Munc13-4 rispetto alla forma wild-type. Inoltre, la simultanea presenza delle due forme mutate mostrava una espressione di Munc13-4 maggiore rispetto alla forma wild-type ma intermedia rispetto a quella ottenuta con le singole mutazioni; questo dato suggerisce che l'alterazione dell'espressione della proteina, nelle cellule trasfettate con il costrutto C757G+C2768G, è un effetto della combinazione delle due mutazioni.

Le mutazioni C757G e C2768G inducono un aumento dell'espressione di Munc13-4 in cellule HMC-1

La proteina Munc13-4 è espressa in diversi tipi di cellule soprattutto nelle cellule ematopoietiche [25-30]. Uno studio ha mostrato che Munc13-4 è coinvolta nella regolazione della secrezione dei lisosomi [30]. Per confermare gli effetti delle mutazioni in un modello utile, la linea di mastcellule HMC-1 è stata trasfettata transientemente con i diversi costrutti. L'anticorpo α -Sv5 riconosceva una banda specifica a 120kDa che corrispondeva all'espressione della proteina Munc13-4.

La forma C2768G presentava una maggiore espressione della proteina rispetto alla forma wild-type (Figura 3A-3B). La trasfezione del plasmide C757G+C2768G, invece, conduceva ad un livello di espressione inferiore rispetto a quello della singola mutazione C2768G ma comparabile con la forma wild-

type (Figura 3A-3B). Questo dato era differente rispetto a quello ottenuto nelle cellule 293T nelle quali l'espressione della forma C757G+C2768G era maggiore della forma wild-type (Figure 2B-3B).

Questi dati hanno confermato la capacità della singola mutazione C2768G di indurre un aumento di espressione della proteina Munc13-4. La trasfezione del costrutto C757G+C2768G presentava una banda di espressione comparabile a quella della forma wild-type; nelle cellule 293T, invece, era stato osservato una differenza tra le due forme. Questo può essere riconducibile al fatto che le cellule 293T non sono sovrapponibili alle cellule HMC-1, che rappresentano un sistema cellulare più simile ai mastociti in coltura primaria. Infatti nelle cellule ematopoietiche, è stato osservato un controllo dei livelli di espressione della proteina [30-42]. Purtroppo non è stato possibile fare un confronto con l'espressione endogena della proteina Munc13-4 poiché nessun anticorpo α -Munc13-4, in commercio, è in grado di riconoscere, in modo efficace, la proteina.

Al fine di indagare una eventuale differenza di espressione di Munc13-4 nel tempo, è stato compiuto, nelle stesse condizioni di trasfezione sopra descritte, un saggio di western blotting condotto su lisati totali di HMC-1. Come mostrato in figura 4, la forma wild-type e le forme mutate di Munc13-4 non hanno mostrato variazioni di espressione nel tempo (24-48-72 ore). Inoltre, in ogni singola condizione, l'andamento dell'espressione proteica è risultata sovrapponibile a quella ottenuta nella prima analisi in western blotting (Figure 3A-4).

Le diverse forme mutate di Munc13-4 influenzano l'espressione intracellulare della proteina Rab27a

Le proteine RabGTPasi sono proteine coinvolte nella regolazione della formazione, motilità e fusione delle vescicole alla membrana plasmatica. Recentemente, l'isoforma Rab27a è stata identificata sulle membrane delle vescicole secretorie [29-33]. Alcuni studi, hanno dimostrato la co-presenza di Munc13-4 con la proteina Rab27a sulle membrane delle vescicole in molti tipi cellulari (piastrine, linfociti T, NK, mastocellule) [27-30-34-42]. Al fine di valutare i livelli di espressione della proteina Rab27a, è stato compiuto un saggio di western blotting su lisati totali di cellule HMC-1 trasfettate con i diversi costrutti per 48 ore. L'anticorpo α -Rab27a riconosceva una banda specifica a 25kDa che corrispondeva all'espressione della proteina Rab27a. Come mostrato in figura 5A, le cellule trasfettate con la forma wild-type di Munc13-4 esprimevano una maggiore quantità di Rab27a rispetto alle cellule di controllo non trasfettate. Al contrario, le trasfezioni delle forme mutate C757G, C2768G, C757G+C2768G davano origine a livelli di espressione di Rab27a inferiori rispetto a quelli osservati, nelle cellule di controllo non trasfettate, e nella forma wild-type (Figura 5A-5B). Questi risultati suggeriscono una capacità, da parte delle forme mutate di Munc13-4, di influenzare negativamente l'espressione della proteina Rab27a sulle membrane delle vescicole. Infatti le mutazioni C757G e C2768G sono presenti, rispettivamente, nelle

regioni della proteina Munc13-4 coinvolte nel legame con Rab27a (dominio C2) e nella localizzazione di Munc13-4 sulla membrana delle vescicole (dominio MHD) [30-42].

L'attivazione delle cellule HMC-1 porta un aumento dell'espressione di Rab27a nelle cellule trasfettate con le forme mutate di Munc13-4

Nei saggi precedenti, l'analisi in western blotting dell'espressione proteica di Munc13-4 e Rab27a è stata condotta su lisati totali di cellule HMC-1 non stimolate. Tuttavia, l'associazione tra la proteina Munc13-4 e Rab27a avviene soltanto in seguito ad uno stimolo attivatorio. La stimolazione porta la forma attiva di Rab27a (Rab27GTP) a interagire con Munc13-4; tale associazione è importante nella regolazione del processo di secrezione [25-30-24]. Al fine di valutare l'espressione delle forme mutate di Munc13-4 e della proteina Rab27a in cellule attivate, è stato condotto un saggio di western blotting su lisati totali di cellule HMC-1 stimolate. Le cellule sono state stimolate con il peptide di origine batterica fMLP in grado di interagire con il suo recettore specifico (FPR1) sulla superficie delle cellule. L'anticorpo α -Rab27a riconosceva la proteina Rab27a con una banda specifica a 25kDa. Come mostrato in figura 6A, l'espressione delle forme mutate di Munc13-4 era sovrapponibile a quella ottenuta nelle cellule HMC-1 in assenza di stimolo (Figure 3B-4A). La proteina Rab27a mostrava livelli di espressione comparabili in tutte le condizioni di trasfezione (Figura 6A-6C). Questo dato era differente rispetto a quello ottenuto nelle cellule HMC-1 non attivate. Tale esperimento suggerisce la presenza di altri fattori in grado di influenzare e controllare la proteina Rab27a, riportandola a livelli adeguati di espressione.

Munc13-4 è un regolatore positivo della degranolazione in cellule HMC-1 attivate

La funzione della proteina Munc13-4 è stata descritta nei linfociti CTL e nelle altre cellule del tessuto ematopoietico [30-34-42]. In particolare, nelle mastcellule, la proteina Munc13-4 è coinvolta nella regolazione della fusione delle vescicole con la membrana plasmatica e la successiva secrezione del loro contenuto [41]. Uno studio ha dimostrato che Munc13-4 è localizzata sulla membrana delle vescicole secretorie in prossimità di CD63, uno specifico marcatore per le membrane dei lisosomi ed endosomi tardivi [30]. La stimolazione delle mastcellule conduce alla migrazione delle vescicole verso la membrana plasmatica e all'esocitosi del loro contenuto. La migrazione delle vescicole determina una diminuzione dell'espressione citoplasmatica di CD63 con un aumento del marcatore sulla superficie delle cellule [41]. Munc13-4 sembra, quindi, svolgere un ruolo importante nel controllo della degranolazione nelle mastcellule [30]. Al fine di definire l'effetto delle mutazioni sulla secrezione dei granuli, cellule HMC-1 48 ore dopo la trasfezione sono state stimolate con il peptide fMLP.

L'espressione del marcatore CD63 sulla membrana delle vescicole è stata valutata, dopo marcatura con un anticorpo α -CD63, mediante analisi citofluorimetrica. L'espressione di CD63 nelle cellule di controllo

non trasfettate è stata posta pari a 100. Come mostrato in figura 7, le cellule trasfettate con la forma mutata C757G+C2768G hanno mostrato una maggiore espressione di CD63 rispetto alle cellule HMC-1 di controllo stimulate. Le cellule trasfettate con le singole mutazioni, invece, hanno presentato una percentuale di espressione comparabile a quella ottenuta dalla stimolazione delle cellule non trasfettate (Figura 7). Questi dati suggeriscono che la presenza delle due mutazioni possa diminuire l'attività della proteina Munc13-4 portando ad una minore fusione delle vescicole e, di conseguenza, l'aumento del loro numero a livello citoplasmatico. Al contrario, le forme mutate con singola mutazione sembrano non influenzare il processo di fusione delle vescicole con la membrana plasmatica. E' interessante notare che la trasfezione della forma wild-type di Munc13-4 ha mostrato un incremento dell'espressione di CD63; questo suggerisce che una maggiore espressione della proteina Munc13-4 possa condurre ad un effetto inibitorio. Questo esperimento conferma il ruolo di Munc13-4 nel controllo del processo di fusione [30-41-42].

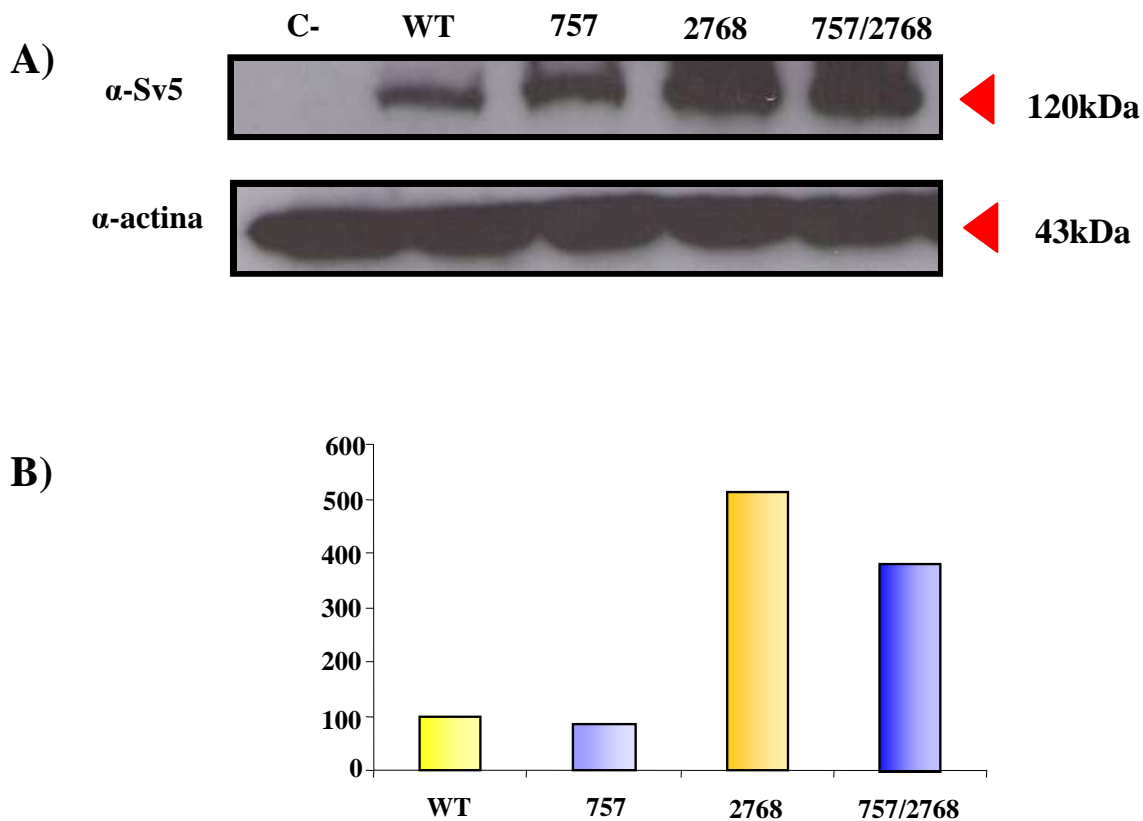


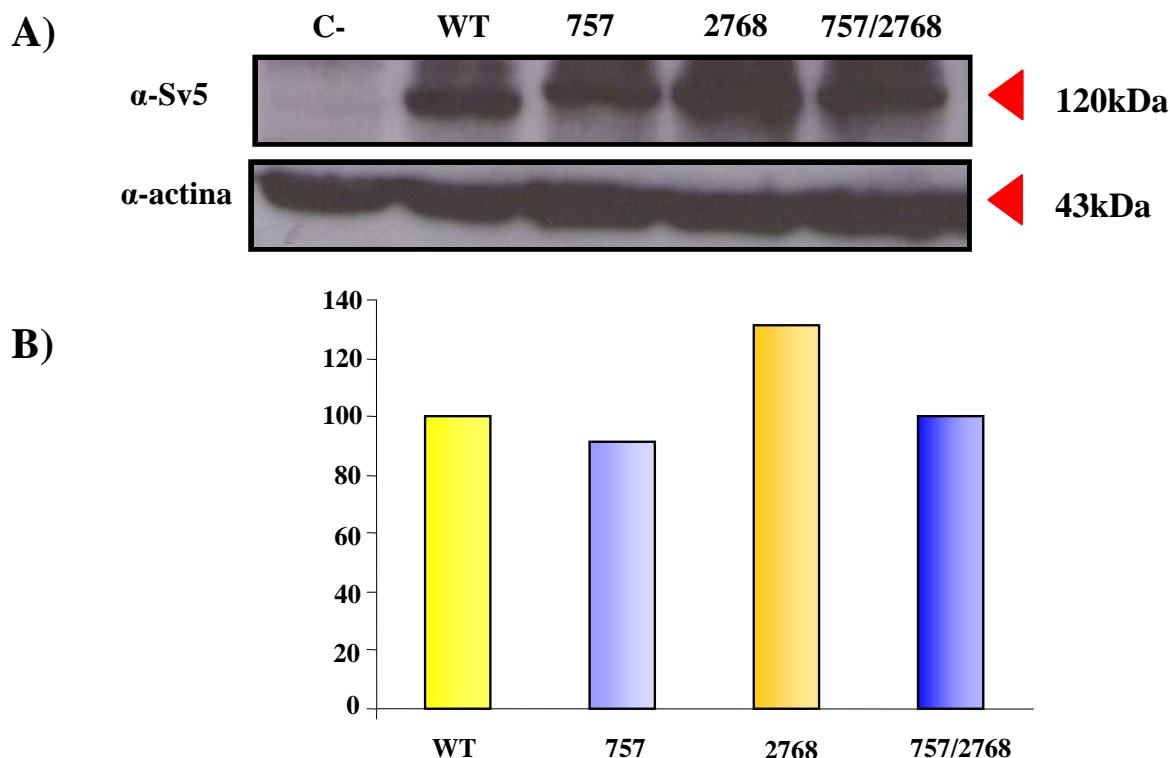
Figura 2

Western Blot di lisati cellulari ottenuti da cellule 293T trasfettate

(A) Cellule 293T non trasfettate (C-); costrutto contenente il cDNA della forma wild-type Munc13-4 (WT); costrutto contenente il cDNA della forma mutata C757G (757); costrutto contenente il cDNA della forma mutata C2768G (2768); costrutto contenente il cDNA della forma mutata C757G+C2768G (757/2768). L'analisi è compiuta 48 ore dopo la trasfezione.

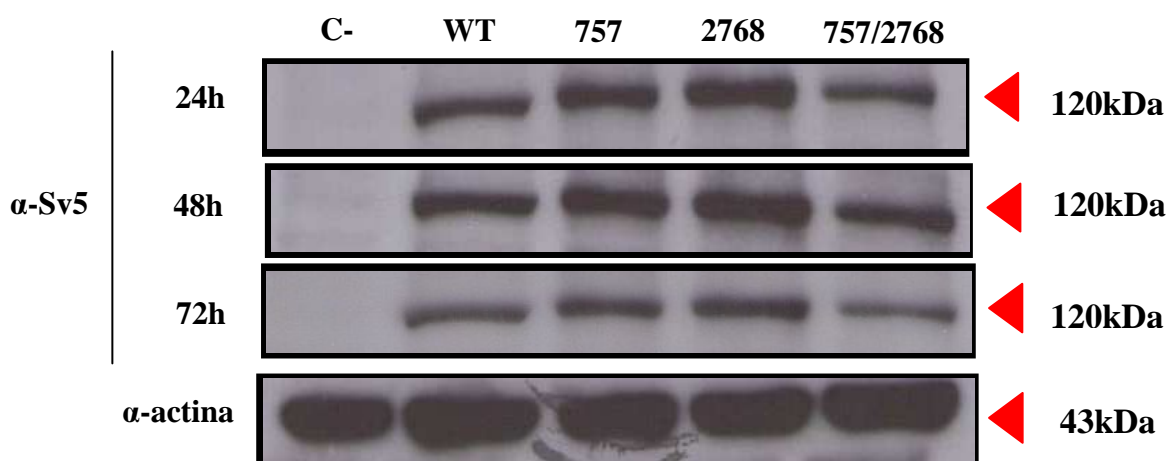
La rilevazione è effettuata con mAb α -Sv5; la normalizzazione è verificata tramite mAb α -actina..

(B) Analisi densitometrica. I risultati sono relativi al valore della forma wild-type posto uguale a 100% e normalizzati sull'ammontare dell'actina per ciascuna condizione.

**Figura 3****Espressione di Munc13-4 in lisati cellulari ottenuti da cellule HMC-1 trasfettate**

(A) Cellule HMC-1 non trasfettate (C-); costrutto contenente il cDNA della forma wild-type Munc13-4 (WT); costrutto contenente il cDNA della forma mutata C757G (757); costrutto contenente il cDNA della forma mutata C2768G (2768); costrutto contenente il cDNA della forma mutata C757G+C2768G (757/2768). L'analisi è compiuta 48 ore dopo la trasfezione.

La rilevazione è effettuata con mAb α -Sv5 (120kDa). La normalizzazione è verificata tramite mAb α -actina (43kDa). (B) Analisi densitometrica. I risultati sono relativi al valore della forma wild-type posto uguale a 100% e normalizzati sull'ammontare dell'actina per ciascuna condizione.

**Figura 4****Espressione nel tempo di Munc13-4 in lisati cellulari ottenuti da cellule HMC-1 trasfettate**

Cellule HMC-1 non trasfettate (C-); costrutto contenente il cDNA della forma wild-type Munc13-4 (WT); costrutto contenente il cDNA della forma mutata C757G (757); costrutto contenente il cDNA della forma mutata C2768G (2768); costrutto contenente il cDNA della forma mutata C757G+C2768G (757/2768).

La rilevazione è effettuata con mAb α -Sv5 (120kDa).

La normalizzazione è verificata tramite mAb α -actina (43kDa).

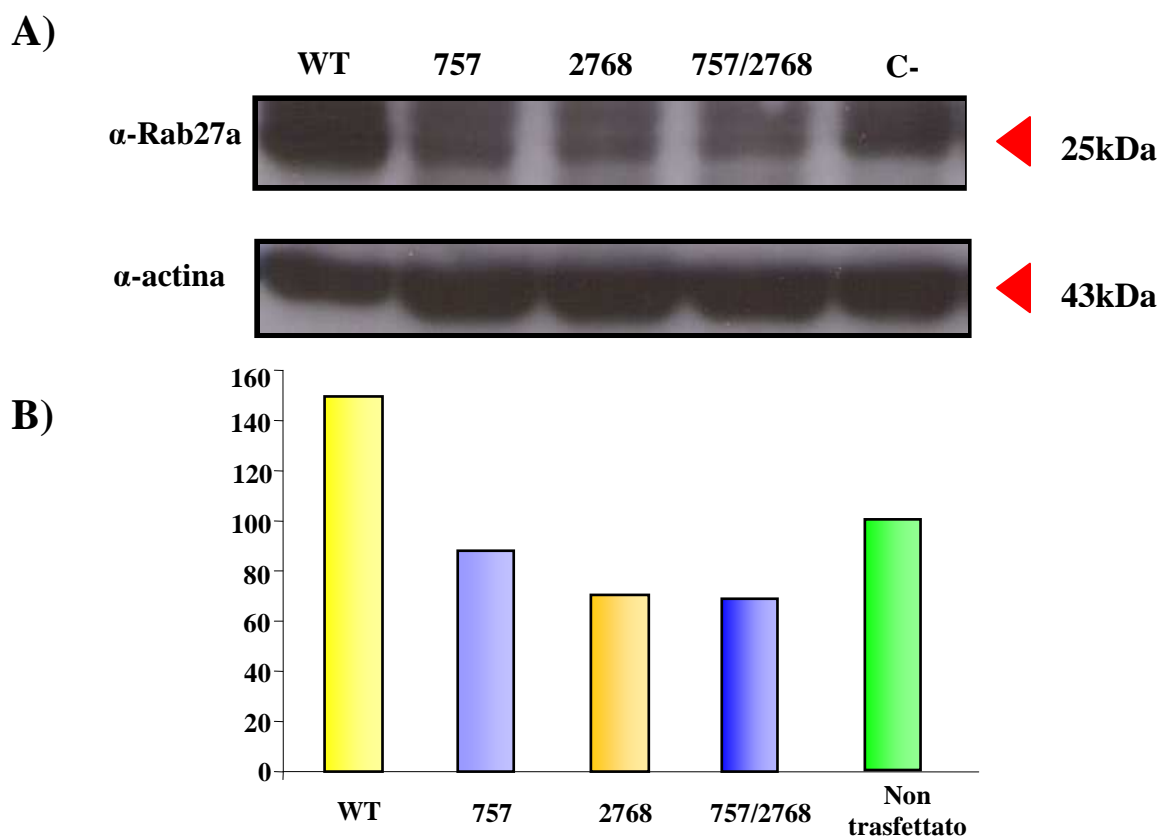
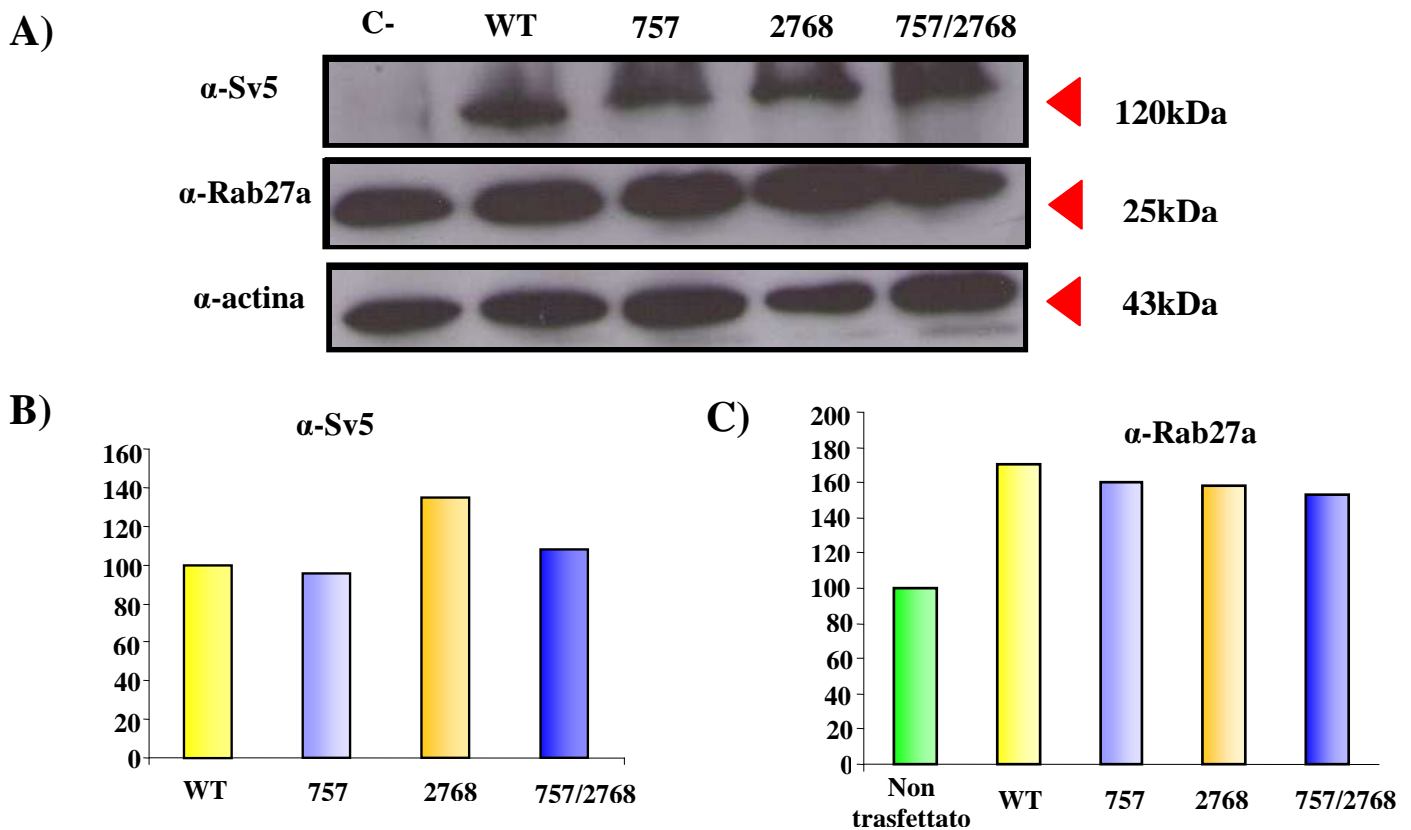


Figura 5

Espressione intracellulare della proteina Rab27a in cellule HMC-1 trasfettate

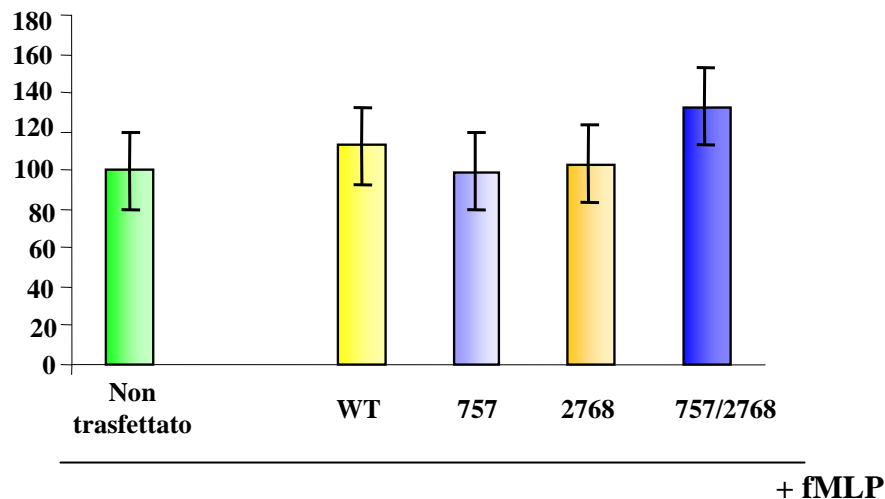
(A) Cellule HMC-1 sono trasfettate con i diversi costrutti contenenti il cDNA della forma wild-type e delle forme mutate di Munc13-4. L'analisi è compiuta 48 ore dopo la trasfezione.

La rilevazione è effettuata con mAb α -Rab27a (25kDa). La normalizzazione è verificata tramite mAb α -actina (43kDa). (B) Analisi densitometrica. I risultati sono relativi al valore della forma wild-type posto uguale a 100% e normalizzati sull'ammontare dell'actina per ciascuna condizione.

**Figura 6****Espressione di Munc13-4 e Rab27a in lisati cellulari ottenuti da cellule HMC-1 attivate con fMLP**

(A) Cellule HMC-1 sono trasfettate, per 48 ore, con i diversi costrutti contenenti il cDNA della forma wild-type e delle forme mutate di Munc13-4. Le cellule, in seguito, sono stimulate con 10^{-7} M fMLP per 10 minuti; la reazione è bloccata centrifugando la sospensione per 1 minuto a 4°C .

La rilevazione è effettuata con mAb α -Sv5 (120kDa) e α -Rab27a (25kDa). La normalizzazione è verificata tramite mAb α -actina (43kDa). (B-C) Analisi densitometrica. I risultati sono relativi al valore della forma wild-type posto uguale a 100% e normalizzati sull'ammontare dell'actina per ciascuna condizione.

**Figura 7****Valutazione dell'espressione di CD63 in cellule HMC-1 attivate con fMLP**

Cellule HMC-1 sono trasfettate, per 48 ore, con i diversi costrutti contenenti il cDNA della forma wild-type e delle forme mutate di Munc13-4. Le cellule, in seguito, sono stimulate con fMLP (10^{-7} M) per 10 minuti; la reazione è bloccata centrifugando la sospensione per 1 minuto a 4°C . L'espressione di CD63 sulle membrane delle vescicole è valutata con un mAb α -CD63 coniugato FITC. L'espressione di CD63 nelle cellule di controllo non trasfettate è stata posta pari a 100. ($p < 0.05$, Mann-Whitney U-test).

DISCUSSIONE

I pazienti con sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) sono portatori di difetti funzionali a carico del sistema Fas/FasL e sviluppano malattie autoimmuni e linfoproliferazione [17].

Diverse evidenze suggeriscono che l'ALPS sia geneticamente eterogenea: in differenti famiglie possono essere coinvolti geni diversi. I pazienti con ALPS e quelli con linfoistiocitosi emofagocitica familiare (FHL) hanno in comune un quadro linfoproliferativo ed una maggior suscettibilità allo sviluppo di linfoma. Alla base di entrambe le patologie, vi sono mutazioni in geni coinvolti nel processo di citotossicità cellulo-mediata, rispettivamente fas e perforina.

Un lavoro svolto nel nostro laboratorio ha dimostrato che alcune variazioni del gene di perforina possono concorrere allo sviluppo del ALPS [46]. Inoltre, negli ultimi anni, studi condotti su pazienti affetti da FHL hanno identificato variazioni del gene di Munc13-4 coinvolte nel deficit di secrezione di perforina [25]. Questo ha suggerito che la proteina Munc13-4 potesse concorrere allo sviluppo del ALPS.

Al fine di indagare questa ipotesi, è stato condotto uno studio volto a identificare e caratterizzare eventuali mutazioni del gene di Munc13-4 in pazienti affetti da ALPS/DALD. Il sequenziamento del gene UNC13D ha portato all'identificazione di due nuove sostituzioni nucleotidiche in eterozigosi in un paziente ALPS-I. La prima variazione in posizione +757(C/G), nell'esone-10, porta un cambio aminoacidico che determina una sostituzione del codone CTG (codificante per una leucina) con il codone GTG (codificante per una valina). La seconda variazione in posizione +2768(C/G), nell'esone-29, porta un cambio aminoacidico che determina una sostituzione del codone CTG (codificante per una serina) con il codone TGT (codificante per una cisteina).

Le mutazioni C757G e C2768G sono presenti, rispettivamente, nelle regioni della proteina Munc13-4 coinvolte nel legame con Rab27a e nella localizzazione sulla membrana delle vescicole.

In seguito, abbiamo voluto valutare gli effetti delle mutazioni a livello cellulare e molecolare. Il primo dato ottenuto dai nostri esperimenti è stato che le mutazioni alterano l'espressione della proteina Munc13-4. Questo è stato dimostrato mediante trasfezione, in un sistema eterologo quale le cellule 293T, del cDNA codificante per le forme mutate C757G, C2768G e C757G+C2768G. L'analisi in western blotting ha mostrato la diversa espressione delle forme mutate di Munc13-4 rispetto alla forma wild-type.

La proteina Munc13-4 è espressa in diversi tipi cellulari soprattutto nelle mastcellule [30] ed è coinvolta nella regolazione della secrezione dei lisosomi. Al fine di indagare gli effetti delle mutazioni in un modello utile, la linea cellulare mastocitaria HMC-1 è stata trasfettata con i plasmidi contenenti i diversi costrutti. I dati emersi, dall'analisi in western blotting, hanno permesso di confermare la capacità delle mutazioni di aumentare l'espressione della proteina Munc13-4. La trasfezione del costrutto C757G+C2768G mostrava un livello di espressione della proteina

comparabile a quello della forma wild-type. Questo dato era differente rispetto a quello ottenuto nelle cellule 293T nelle quali, invece, era stato osservato una differenza tra le due forme. Purtroppo non è stato possibile fare un confronto con l'espressione endogena della proteina Munc13-4 poiché nessun anticorpo α -Munc13-4, in commercio, è in grado di riconoscere, in modo efficace, la proteina.

Le cellule 293T non sono sovrapponibili alle cellule HMC-1, che rappresentano un sistema cellulare più simile ai mastociti in coltura primaria. L'insieme dei dati, ottenuti con le analisi in western blotting, ha permesso di ipotizzare due possibili meccanismi per descrivere gli effetti delle mutazioni: a) l'espressione della forma C757G+C2768G, che risulta essere paragonabile alla forma wild-type, potrebbe essere il risultato della degradazione di Rna messaggero (mRna). L'aumento di mRna conduce ad un processo di degradazione al fine di ripristinare una adeguata e funzionale espressione della proteina; b) l'espressione di Munc13-4 è controllata da altre proteine effettrici all'interno di un sistema complesso di regolazione. La presenza delle mutazioni C757G+C2768G determina una variazione strutturale della proteina Munc13-4, un cambiamento nel sistema di regolazione e quindi dell'espressione della proteina.

Per indagare ulteriormente l'effetto delle mutazioni nel tempo, è stata valutata l'espressione della proteina Munc13-4 in cellule HMC-1 dopo 24-48-72 ore dalla trasfezione. L'espressione della forma wild-type e delle forme mutate della proteina non ha mostrato variazioni nel tempo; inoltre, in ogni singola condizione, l'andamento dell'espressione proteica è risultata sovrapponibile a quella osservata nella prima analisi in western blotting su cellule HMC-1.

Nel loro insieme questi risultati hanno suggerito l'importanza delle mutazioni C757G e C2768G nei livelli di espressione della proteina Munc13-4 e hanno permesso di ipotizzare che le differenze di espressione, riscontrate tra cellule 293T e cellule HMC-1, fossero riconducibili ad un sistema complesso di regolazione dell'esocitosi. Molti studi hanno cercato di identificare i fattori coinvolti nel processo di secrezione dei granuli [27-28-30-41-42]. Una classe di proteine coinvolte nella coordinazione di tale processo sono le proteine RabGTPasi. Recenti studi hanno mostrato che un membro di questa famiglia, Rab27a, regola il trasporto e la fusione delle vescicole alla membrana plasmatica in molti tipi di cellule (linfociti CTL, piastrine, cellule NK, mastcellule). Rab27a è distribuito sulle membrane delle vescicole secretorie e agisce insieme alla proteina effettrice Munc13-4 [27-30-42]. Pertanto, al fine di verificare gli effetti delle mutazioni di Munc13-4 sui livelli di espressione della proteina Rab27a, è stato compiuto un saggio di western blotting su lisati totali di cellule HMC-1 48 ore dalla trasfezione

I risultati ottenuti, nelle cellule trasfettate con le forme mutate di Munc13-4, hanno mostrato una espressione di Rab27a inferiore alle cellule trasfettate con la forma wild-type. L'insieme di questi

dati suggerisce un coinvolgimento di Munc13-4 nel modulare l'espressione di Rab27a sulla membrana delle vescicole; tuttavia l'esatto meccanismo è ancora sconosciuto. Uno studio ha descritto un modello nel quale il processo di maturazione dei granuli citotossici, nei linfociti CTL, richiede la co-operazione di endosomi tardivi (che esprimono Rab27a e Rab7) con endosomi di riciclo (che esprimono Rab11 e Munc13-4) per formare vescicole esocitiche. Queste, in presenza di uno stimolo di attivazione, si uniscono con i granuli citotossici per formare granuli maturi [42]. In contrasto con questo modello, uno studio ha suggerito la presenza costitutiva di Rab27a e Munc13-4 sulla membrana delle vescicole nelle cellule ematopoietiche [30]. Questi dati suggeriscono una reciproca dipendenza tra Rab27a e Munc13-4.

E' interessante notare che la mutazione C757G è presente nel dominio C2 (per il legame con Rab27a) mentre la mutazione C2768G è presente nel dominio MHD (per la localizzazione sui lisosomi). Questo permette di ipotizzare che i due domini svolgono un ruolo importante nel reclutamento di Rab27a, da parte di Munc13-4, durante il processo di esocitosi.

Molti lavori hanno mostrato l'associazione della proteina Munc13-4 con Rab27a in seguito ad uno stimolo attivatorio [25-30-24]. La stimolazione delle cellule porta la forma attiva di Rab27a (Rab27GTP) a legare la proteina Munc13-4; tale associazione è importante nella regolazione del processo di secrezione. Pertanto, per valutare l'espressione delle forme mutate di Munc13-4 e della proteina Rab27a in cellule attivate, le cellule HMC-1 sono state trasfettate e, in seguito, stimolate con il peptide fMLP. I risultati hanno mostrato che l'espressione delle forme mutate di Munc13-4 era sovrapponibile a quella ottenuta nelle cellule HMC-1 in assenza di stimolo. La proteina Rab27a mostrava livelli di espressione comparabili in tutte le condizioni di trasfezione; questo dato era differente rispetto quello osservato nelle cellule non attivate. E' possibile ipotizzare la presenza di altri fattori coinvolti nella regolazione del processo di secrezione; questi fattori sono in grado di influenzare e controllare la proteina Rab27a, riportandola a livelli adeguati di espressione.

Il processo di fusione delle vescicole con la membrana plasmatica e la secrezione del loro contenuto è stato descritto in diversi lavori [26-27-42]. Nelle mastcellule, Munc13-4 svolge un ruolo molto importante nella fase di fusione. Uno studio ha dimostrato che la proteina Munc13-4 è localizzata sulla membrana delle vescicole secretorie in prossimità di CD63 (uno specifico marcatore per le membrane dei lisosomi ed endosomi tardivi) ed è coinvolta nel controllo della degranulazione [30]. La stimolazione delle mastcellule conduce alla migrazione delle vescicole verso la membrana plasmatica e determina un aumento del marcatore CD63 sulla superficie delle cellule [41]. Pertanto, per definire l'effetto delle mutazioni sulla secrezione dei granuli, cellule HMC-1 sono state stimolate con il peptide fMLP. L'analisi è stata compiuta valutando l'espressione di CD63 sulla membrana delle vescicole; i risultati hanno mostrato una maggiore espressione di CD63 nelle

cellule trasfettate con la forma mutata C757G+C2768G rispetto alle cellule di controllo stimolate e alla forma wild-type. Le cellule trasfettate con le singole mutazioni, invece, hanno presentato una percentuale di espressione comparabile a quella ottenuta nelle cellule non trasfettate. Questi dati suggeriscono che la presenza delle due mutazioni possa diminuire l'attività della proteina Munc13-4 portando una minore fusione delle vescicole e, di conseguenza, l'aumento del loro numero a livello citoplasmatico. Al contrario, le forme mutate con singola mutazione sembrano non influenzare il processo di fusione delle vescicole con la membrana plasmatica; questo potrebbe suggerire una capacità della proteina Munc13-4 endogena di compensare l'attività della forma mutata. È interessante notare che la trasfezione della forma wild-type di Munc13-4 ha mostrato un incremento dell'espressione di CD63; questo suggerisce che una maggiore espressione della proteina possa condurre ad un effetto inibitorio. Questa ipotesi è valorizzata da uno studio che ha dimostrato l'effetto inibitorio dato dalla maggiore espressione della proteina Slp4, proteina effettrice di Rab27a [39]. Nel complesso, questi risultati evidenziano l'importanza della proteina Munc13-4 nel controllo della fase di fusione delle vescicole con la membrana plasmatica.

Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano che le mutazioni riscontrate sul gene UNC13D conducono ad un cambiamento dell'espressione della proteina Munc13-4. Le alterazioni identificate nel dominio C2 e MHD della proteina sembrano alterarne l'attività; infatti la forma mutata C757G+C2768G mostra la capacità di influenzare negativamente la proteina Rab27a sulle membrane delle vescicole esocitiche. Questo permette di ipotizzare una correlazione tra le due proteine; tuttavia l'esatto meccanismo è ancora sconosciuto. L'attivazione delle cellule mastocitarie, trasfettate con le forme mutate di Munc13-4, mostra un aumento dell'espressione di Rab27a. Questo dato permette di ipotizzare la presenza di altri fattori coinvolti nella regolazione del processo di secrezione. I risultati confermano, anche, il coinvolgimento della proteina Munc13-4 nel controllo della fase di fusione delle vescicole alla membrana plasmatica. Infatti, la trasfezione della forma mutata C757G+C2768G conduce ad una maggiore espressione del marcatore CD63 a livello citoplasmatico; questo dato suggerisce una diminuzione dell'attività di Munc13-4 che porta una minore fusione delle vescicole e, di conseguenza, l'aumento del loro numero nel citoplasma. La proteina Munc13-4 sembra essere, quindi, una chiave del meccanismo di regolazione della fusione; una alterazione della sua struttura può portare una diminuzione della sua espressione proteica e funzione effettrice.

PROSPETTIVE FUTURE

Lo scopo di questo lavoro era quello di caratterizzare due mutazioni individuate nel gene UNC13D in un paziente affetto da ALPS-I e dimostrare il coinvolgimento di Munc13-4 nello sviluppo della malattia. Lo studio ha permesso di dimostrare che le mutazioni riscontrate determinano un cambiamento dell'espressione della proteina Munc13-4. Inoltre, tali mutazioni sembrano in grado di alterare l'attività della proteina che, normalmente, agisce durante il processo di secrezione; Munc13-4 regola la fusione delle vescicole alla membrana plasmatica. Tuttavia, gli aspetti del ruolo di Munc13-4 nelle funzioni secretorie non sono ancora chiariti.

Studi futuri permetteranno di indagare i meccanismi del processo di secrezione; in particolare, lo studio valuterà il legame di Rab27a con le forme mutate di Munc13-4 e il processo di degranulazione. Inoltre, un obiettivo sarà quello di indagare gli effetti delle mutazioni nell'attività citotossica delle cellule NK e linfociti CTL. Questo potrebbe chiarire il ruolo della proteina Munc13-4 nella secrezione dei granuli litici e il suo coinvolgimento nello sviluppo del ALPS.

BIBLIOGRAFIA

1. Goldsby R., A., Kindt T., J., Osborne B., A. (2005) *Kuby 2/e*, 473-521
2. Dianzani U., Chiocchetti A., Ramenghi U. (2002) *Life Sciences* **72**, 2803-2824
3. Cho S., C., Choi E., J. (2002) *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 24-27
4. Los M., Stroh C., Janicke R., U., Engels I., H., Schulze-Osthoff K. (2001) *Trends in Immunology* **22**, 31-34
5. 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
6. Pop C., Timmer J., Sperandio S., Salvesen G., S. (2006) *Molecular Cell* **22**, 269-275
7. Nishida K., Yamaguchi O., Otsu K. (2008) *Circulation Research* **103**, 343-351
8. Brenner D., Krammer P., H., Arnold R. (2008) *Oncology Ematology* **66**, 52-64
9. Mateo V., Menager M., Saint-Basile G., Stoizenberg M., C., Roquelaure B., André N.,
10. Ramenghi U., Bonissoni 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
11. Rieux-Laucat F., Fischer A., Le Deist F. (2003) *Current Opinion in Immunology* **15**, 325-331
12. Drappa J., Vaishnav A., K., Sullivan K., E., Chu J., L., Elkon K., B. (1996) *The New England Journal of Medicine* **335**, 1643-1649
13. Worth A., Thrasher A., J., Gaspar H., B. (2006) *British Journal of Haematology* **133**, 124-140
14. Lamkanfi M., Festjens N., Declercq W., Berghe T., V., Vandenabeele P. (2007) *Nature* **14**, 44-55
15. Rieux-Laucat F., Le Deist F., Fischer A. (2003) *Cell Death and Differentiation* **10**, 124-133
16. Chatinet A., M., Stolzenberg M., C., Loffredo M., S., Shaffner C., Ducrot N., Rieux-laucat F. (2009) *Blood* **113**, 3027-3030
17. Oliveira JB., Bleesing JJ., Dianzani U., Fleisher TA., Jaffe ES., Lenardo MJ., Rieux-Laucat F., Siegel RM., Su HC., Teachey DT., Rao VK. (2010) *Blood*
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. Kopecky O., Lukesova S. (2007) *International Journal of Immunogenetics* **34**, 225-229
20. 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
21. Holzlova E., Vonarbourg C., Stolzenberg M., Arkwright P., D., Selz F., Prieur A., M., Blanche S., Bartunkova J., Vilmer E., Rieux-Laucat F. (2004) *The New England Journal of Medicine* **351**, 409-418
22. Menasche G., Pastural E., Feldmann J., Certain S., Ersoy F., Dupuis S. (2000) *Nature Genetic* **25**, 173-176
23. De Saint Basile G., Fischer A. (2003) *Current Opinion Rheumatology* **15**, 436-445
24. Stepp S., Dufourcq-Lagelouse R., Le Deist F., Bhawan S., Certain S., Mathew P. (1999) *Science* **286**, 1957-1959
25. Feldmann J., Callebaut I., Raposo G., Certain S., Bacq D., Dumont C. (2003) *Cell* **115** 461-473
26. De Saint Basile G., Menaschè G., Fischer A. (2010) *Nature* **11**, 568-579
27. Shirakawa R., Higashi T., Tabuchi A., Yoschioka A., Nischioka H., Horiuchi H. (2004) *The Journal of Biological Chemistry* **11** 10730-10737
28. Yi Z., Yokota H., Torii S., Aoki T., Hosaka M., Zhao S., Takata K., Takeuchi T., Izumi T. (2002) *Molecular and Cellular Biology* **22** 1858-1867
29. Tsuboi T., Fukuda M. (2006) *Journal of Cell Science* **119** 2196-2203

30. Neef M., Wieffer M., Jong A., Negroiu G., Metz C., van der Sluijs P. (2005) *Molecular Biology of the Cell* **16** 731-741
31. Lee M., Mishra A., Lambright D. (2009) *Traffic* **10** 1377-1389
32. Zerial M., McBride H. (2001) *Molecular Cell Biology* **2** 107-119
33. Goishi K., Mizuno K., Nakanishi H., Sasaki T. (2004) *Biochemical and Biophysical Research* **324** 294-301
34. Wood S., Meeths M., Chiang S., Bechensteen A., Boelens Bryceson Y. (2009) *Blood* **114** 4117-4127
35. Hong W. (2005) *Science* **15** 644-650
36. Fukuda M. (2008) *Cellular and Molecular Life Sciences* **65** 2801-2813
37. Izumi T., Gomi H., Kasai K., Mizutani S., Torii S. (2003) *Cell Biology* **28** 465-474
38. Fukuda M. (2003) *Journal Biological Chemistry* **278** 15390-15396
39. Fukuda M., Kanno E., Saegusa C., Ogata Y., Kuroda T. (2002) *Journal of Biological Chemistry* **277** 39673-39678
40. Koch H., Hofmann K., Brose N. (2000) *Biochemical Journal* **349** 247-253
41. Pivot-Pajot C., Varoquaux F., Saint Basile G., Bourgoin S. (2008) *The Journal of Immunology* **180** 6786-6797
42. Menager M., Menasche G., Romao M., Knapnougel P., Hsuan Ho C., Saint Basile G. (2007) *Nature Immunology* **8** 257-267
43. Santoro A., Cannella S., Bossi G., Gallo F., Trizzino A., Pende D., Dieli F., Bruno G., Aricò M. (2006) *Journal Medical Genetic* **43** 953-960
44. Sato T., Sato N., Takahashi S., Koshiha H., Kikuchi K. (1986) *Cancer Research* **46** 4384-9
45. DuBridge R., Tang P., Hsia H., Leong P., Miller J., Calos M. (1987) *Molecular and Cellular Biology* **7**, 379-387
46. Clementi R., Chiocchetti A., Cappellano G., Cerutti E., Ferretti M., Orilieri E., Dianzani I., Ferrarini M., Bregni M., Danesino C., Bozzi V., Putti MC., Cerutti F., Cometa A., Cometa A., Locatelli F., Maccario R., Ramenghi U., Dianzani U. (2006) *Blood* **108** 3079-3084
47. Rudd E., Bryceson YT., Zheng C., Edner J., Wood SM., Ramme K., Gavhed S., Gürgey A., Hellebostad M., Bechensteen AG., Ljunggren HG., Fadeel B., Nordenskjöld M., Henter JJ, (2008) *Journal of Medical Genetics* **45** 134-141

Seminari interni al Dipartimento di Scienze Mediche AA 2009-2010

Regolazione del metabolismo del ferro: nuove acquisizioni

Prof.ssa C. Camaschella

10/10/2009

Naproxinod, un nuovo anti-infiammatorio con elevata tollerabilità cardiovascolare

Dr.E. Ongini

4/11/09

ALK e tumorigenesi

Prof. G. Inghirami

17/11/09

Use of MAR epigenetic regulators for therapeutic expression

Prof. N. Mermoud

30/11/09

Controllo funzionale dei linfociti T da parte di adenosina trifosfato (ATP) extracellulare

Prof. F. Grassi

14/12/09

LSD1, Lysine Specific Demethylase1: insight into a new epigenetic regulator involved in neuronal gene regulation

Dr. E. Battaglioli

20/01/10

Dal difetto genetico all'infiammazione

Prof. L. Maiuri

28/01/10

R & D of magnetic-nanoparticles and carriers for drugs

Dr. G. Baldi

9/02/10

Prediction of RNA-RNA interaction

Prof. H.Tafer

26/05/10

Combating Bioterrorism: New Antidotes for an Old Poison

Dr. S.R. Ellis

10/06/10

Fenotipo e cellule staminali tumorali nei glomi

Prof. D. Schiffer

14/06/10

MicroRna nell terapia tumorale

Prof.ssa C. Ponzetto

15/06/10

Identificazione di antigeni per la diagnosi e la terapia del carcinoma pancreatico mediante l'analisi sierologica del proteoma

Prof. F. Novelli

30/06/10

Role of membrane lipids in neuronal synapses organization

Prof.ssa P. Camoletto

5/07/10

Ruolo delle microvescicole nella comunicazione tra cellule

Prof. G. Camusi

6/09/10

Prevention and cure of autochthonous mammary carcinomas in her2 transgenic mice?

Prof.ssa F. Cavallo

17/09/10

Le cellule staminali tumorali: dalla biologia alla clinica

Prof. R. De Maria

22/09/10

Preventing Persisters: Targeting Epigenetic Changes in Cancer Chemotherapy

Dr. S.R. Ellis

23/09/10

ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA:

- Lezioni frontali di oncologia (Prof. Albano) interni al dipartimento
- Journal Club interni al dipartimento

PARTECIPAZIONE CONGRESSI

- Riunione scientifica "Scuola Dianzani"
Nuove acquisizioni in patologia molecolare
Dipartimento di Scienze Mediche-Novara, 11/12/2009
- Convegno IRCAD
Dal laboratorio al paziente
Novara, 26/02/2010
- 7th International Congress on Autoimmunity
Autoimmunity
Lubiana-Slovenia, 5-9/05/2010