

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



**Dottorato di Ricerca  
in  
Medicina Molecolare**

*Ciclo XXIV*

**Caratterizzazione di mutazioni identificate  
nei geni di Munc13-4 e SAP in pazienti affetti  
da Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS)**

**RESPONSABILE**

Prof. Dianzani Umberto

**CANDIDATO**

Melensi Matteo

## ***INDICE***

<b>Introduzione</b>	Pag 3
<b>Materiali e Metodi</b>	Pag 24
<b>Risultati</b>	Pag 27
<b>Discussione</b>	Pag 34
<b>Materiali e Metodi, sezione 2</b>	Pag 38
<b>Risultati, sezione 2</b>	Pag 41
<b>Discussione, sezione 2</b>	Pag 46
<b>Prospettive Future</b>	Pag 49
<b>Bibliografia</b>	Pag 51

# 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 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'interazione del recettore con l'antigene presentato su MHC e -un secondo segnale proveniente da molecole costimolatorie che interagiscono con i loro rispettivi ligandi presenti sulle cellule presentanti l'antigene (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 (danno cellulare) 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 linfofossina 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) [2-3].

Il secondo meccanismo (sistema attivo), 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 [2-3].

### **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 [4-5]) 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) [6].

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 [7]. I frammenti 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 [8]. In seguito a clivaggio, la caspasi-9 assume una conformazione attiva in grado 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. 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 [9].

### 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 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 [4].

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 [4].

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, 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 [4]. 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].

Le malattie autoimmuni sono più frequenti 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 [2-3]. 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/lpr* mostrano linfoproliferazione con linfadenopatia, splenomegalia, espansione policlonale di linfociti T doppi negativi CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (DNT) e manifestazioni autoimmuni; i topi *gld/gld* sono caratterizzati da linfoproliferazione (in assenza di DNT 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 è stata descritta una malattia simile a quella dei topi *lpr* o *gld* denominata “Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa” (ALPS-OMIM#601859) [11-12-13]. La malattia si sviluppa in età pediatrica ed è caratterizzata da linfadenopatia e/o splenomegalia, espansione periferica di linfociti DNT, ridotta funzionalità del sistema Fas, manifestazioni autoimmuni (glomerulonefrite, sindrome di Guillain-Barrè, epatite, artrite, vasculite, LES), citopenie e ipergammaglobulinemie. I pazienti in età adulta sono predisposti allo sviluppo di linfomi [11].

La maggior parte dei pazienti ALPS presentano una mutazione eterozigote nel gene di Fas [10-13-14]; tuttavia in alcuni pazienti sono state ritrovate mutazioni a carico di altri geni.

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) in seguito al legame di FasL, espresso dalle cellule citotossiche, con il recettore Fas espresso sulle cellule target [15].

Una caratteristica comune a tutte le mutazioni è un difetto nell'apoptosi indotta da Fas [10-13-14].

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]:

\*ALPS-FAS caratterizzata da mutazioni in omozigosi o eterozigosi nel gene di Fas che determinano, rispettivamente, perdita completa o riduzione della funzionalità del recettore Fas [17];

\*ALPS-sFAS con mutazioni somatiche in eterozigosi nel gene di 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 DNT abbiano origine da questi linfociti che hanno ricevuto un segnale di morte ma che non possono morire perché portatori del difetto in Fas [18];

\*ALPS-FASLG con mutazioni nel gene TNFSF6 codificante per FasL/CD95L [10];

\*ALPS-CASP10 con mutazioni nel gene di caspasi-10 [14-19]; 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;

\*ALPS-U con fenotipo clinico e immunologico tipico dell'ALPS ma difetto genetico ancora sconosciuto [13] a supporto del fatto che altri fattori non ancora noti sono coinvolti nello sviluppo della malattia.

Recentemente, oltre alla classificazione molecolare dell'ALPS, sono stati identificati alcuni disordini correlati alla malattia; questi pazienti presentano un particolare quadro clinico con mutazioni a carico di altri geni.

E' possibile distinguere pazienti con mutazioni nel gene codificante caspasi-8 (ALPS-CEDS, Caspasi-Eight Deficiency State) che mostrano linfadenopatia-splenomegalia con aumento

marginale di DNT [14-17-19]; mutazioni nel gene di NRAS<sup>1</sup> con riduzione di fattori pro-apoptotici (ALPS-RALD, RAS-associated autoimmune leukoproliferative disease) [20]. La mutazione di un singolo nucleotide porta un cambiamento aminoacidico 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]; e soggetti affetti dalla sindrome linfoproliferativa legata all'X (X-linked lymphoproliferative disease: XLP1) che costituiscono gli ALPS-XLP1 [21].

Nel nostro laboratorio è stato identificato un gruppo di pazienti con un quadro clinico simile ai pazienti ALPS ma privi dell'espansione di linfociti DNT 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 [4-10-22].

I genitori dei pazienti presentano una ridotta funzionalità di Fas (in assenza di segni clinici) 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.

L'ALPS sembra, quindi, presentare un quadro multifattoriale; i pazienti sono eterozigoti per la mutazione nel gene di Fas ma questo non è sufficiente per sviluppare la malattia dato che i genitori portatori della mutazione sono sani. Questo suggerisce che altri fattori genetici, associati anche a fattori ambientali, siano necessari per lo 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<sup>+</sup>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) [23].

---

<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 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 linfoistiocitosi 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 e granuli citoplasmatici anomali nei neutrofilii. La principale manifestazione clinica è la suscettibilità alle infezioni batteriche dovuta alle anomalie dell'attività microbica dei neutrofilii e dei monociti. La malattia è causata da una mutazione del gene LYST che codifica per una proteina coinvolta nella regolazione del movimento lisosomiale e funzione citotossica dei granulociti-neutrofilii. La sindrome è caratterizzata dalla comparsa di 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 tipo2 (FLH2) sottotipo della sindrome HLH. Le mutazioni, a carico del gene PRF1, presenti nei pazienti affetti da FHL2 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 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  $\alpha$ -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.

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

La “Sindrome Linfoproliferativa legata all'X” (OMIM#308240) è un disordine causato da mutazioni sul cromosoma X del gene SH2D1A codificante la proteina SAP (Signaling lymphocyte activation molecole: SLAM-Associated Protein) 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, linfoproliferazione policlonale e/o linfomi delle cellule B, linfocitocitosi, ipogammaglobulinemia in seguito a infezione con Epstein-Barr virus [27-28]. 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 [21].

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 [21].

### **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<sup>+</sup>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<sup>+</sup>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 [25-29-30-31-32].

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 $\gamma$ ) 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 (IP<sub>3</sub>) da parte della PLC $\gamma$  conduce alla fuoriuscita di calcio (Ca<sup>2+</sup>) intracellulare verso il citoplasma. La polarizzazione del MTOC è mediato dal diacilglicerolo (DAG) in maniera Ca<sup>2+</sup>-indipendente mentre il movimento dei granuli è mediata dal Ca<sup>2+</sup>.

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) [31-33].

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 [34].

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 [33]. Recentemente, studi di proteomica hanno evidenziato sulle membrane delle vescicole secretorie la presenza di un'altra isoforma di Rab (Rab27) coinvolta in questo processo [31-35].

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 [34]. Ogni proteina Rab ha una precisa distribuzione cellulare che permette di identificare l'organizzazione di membrana e le caratteristiche delle vescicole [34]. Per esempio, Rab4 e Rab5 sono localizzate sugli endosomi primari, Rab7 sugli endosomi tardivi [34].

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 [31]. Rab27a regola l'esocitosi dei granuli basofili nei mastociti, dei granuli citotossici nei linfociti CTL e dei granuli densi nelle piastrine [35].

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 [31-32].

Le proteine Rab3a e Rab27a possono essere co-esprese sulle membrane delle vescicole delle cellule neuronali, cellule  $\beta$  del pancreas, melanociti e svolgere una differente funzione sul processo di secrezione [30]. 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 siano promotori positivi del trasporto vescicolare [32-36].

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) [37].

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 [36]. In seguito alla fusione (mediata dalla proteine Rab e SNARE) delle vescicole con la membrana plasmatica, il complesso trans-SNARE diventa cis-SNARE con il distaccamento delle proteine v-SNARE e t-SNARE. Questo distaccamento è promosso dall'azione del fattore NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) e  $\alpha$ -SNAP (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein) [36].

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 [36].

I membri della sottofamiglia SNAP (SNAP23, SNAP25, SNAP29: synaptosome-associated protein) appartengono alle proteine con catena leggera t-SNARE; la famiglia delle proteine Sintaxina costituiscono le catene pesanti t-SNARE [31-36].

### 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/granuphilin-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 [38-39].

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 [39].

Al C-terminale, le proteine effettrici hanno due domini C<sub>2</sub> che permettono il legame con i fosfolipidi di membrana durante le fasi del processo di secrezione [39].

Le proteine effettrici legano contemporaneamente le proteine Rab sulla vescicola secretoria e le proteine della membrana plasmatica favorendo la fase di ancoraggio [31].

#### *Slp4*

La proteina effettrice Slp4 presenta due domini C<sub>2</sub> ed è espressa nelle cellule β del pancreas.

Slp4 interagisce, mediante il dominio RBD, con Rab27a e Rab3a [39]. 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 [39].

#### *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 C<sub>2</sub> al C-terminale che, invece, presenta un dominio “coil” in grado di interagire con la miosina-Va [39].

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 [39].

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 [40-41].

Recentemente, alcuni studi hanno identificato la proteina Munc13-4 come ulteriore effettore della proteina Rab27a [25-32-35].

### **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 nelle regioni del cervelletto e controlla il rilascio dei neurotrasmettitori [42].

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, F<sup>557</sup>-I<sup>677</sup> per MHD1 e E<sup>788</sup>-K<sup>894</sup> per MHD2) costituito da  $\alpha$ -elicche con lunghezze e ripetizioni aminoacidiche diverse. Il dominio è essenziale per la localizzazione specifica della proteina [25]

C2 DOMAIN (P<sup>109</sup>-H<sup>284</sup> per C2A e A<sup>904</sup>-P<sup>1047</sup> per C2B) contiene cinque residui di acido aspartico che formano un sito per gli ioni Ca<sup>2+</sup> che mediano il legame con i fosfolipidi di membrana dipendenti dal calcio. La presenza di una  $\alpha$ -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 [25-32].

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 [29]; nelle mastcellule, Munc13-4 è espressa sulla membrana dei lisosomi [43]. Nelle cellule NK, la proteina è espressa sulla membrana dei granuli litici [36].

Munc13-4 conferisce alle vescicole ancorate alla membrana plasmatica uno stato competente alla fusione necessario prima del processo di secrezione [44].

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 [32]. La regione compresa tra gli aminoacidi D<sup>240</sup>-V<sup>543</sup> è necessaria per il legame con la proteina Rab27a [32].

Pazienti affetti da FLH3 mostrano un normale ancoraggio delle vescicole alla membrana plasmatica ma un difetto nella fusione e nel rilascio del loro contenuto [32].

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 [32].

La proteina è coinvolta, anche, nella secrezione dei lisosomi nelle mastcellule e dei granuli densi nelle piastrine [25-32].

Uno studio ha descritto 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 [26-44]. Questo modello è in contrasto con uno studio che afferma l'associazione costitutiva di Rab27a e Munc13-4 sulle membrana dei lisosomi [44].

### **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<sup>+</sup>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 [33-34]. 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 [26-34].

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<sub>t</sub>-SNARE (SNAP23, syntaxina-11/Munc18-2)<sub>v</sub>-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 [29-32-35].

## **Proteina SAP**

Come descritto in precedenza, la “*Sindrome Linfoproliferativa legata all’X*” è un disordine causato da mutazioni sul cromosoma X del gene SH2D1A codificante la proteina SAP.

SAP è una proteina adattatrice intracitoplasmatica di 15 kDa costituita da un singolo dominio SH2 (Src Homology 2) e da una corta coda di 28 aminoacidi all’estremità C-terminale che presenta due tirosine fosforilabili [45]. Il gene SH2D1A (Src Homology 2 Domain 1A containing protein) presente sul tratto cromosomico Xq25-q26 è lungo 25Kb ed è costituito da 4 esoni e 3 introni [27]. La famiglia di SAP comprende tre membri: SAP, EAT2 (Ewing’s sarcoma-associated transcript-2) e, nei roditori, ERT (EAT2-related transducer); a differenza di SAP gli altri due membri sono posizionati in tandem sul cromosoma 1.

SAP è espresso dai linfociti T, dalle cellule NK e NKT, eosinofili, piastrine e in alcune popolazioni di linfociti B [46]. EAT2, invece, è espresso sulle cellule NK, sulle cellule dendritiche (DC) e sui macrofagi.

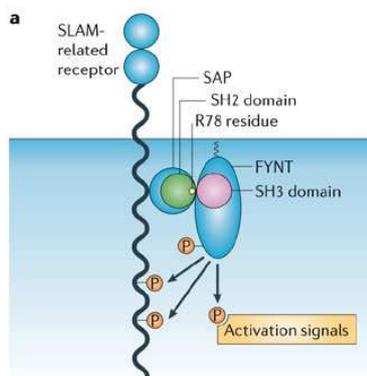
SAP regola la funzione di molti recettori appartenenti alla famiglia SLAM: la proteina interagisce con la coda citoplasmatica dei recettori e fornisce un sito di ancoraggio per le molecole di segnale. La famiglia SLAM comprende sette recettori transmembrana appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline: SLAM (CD150); 2B4 (CD244), Ly-9 (CD229), NTBA (SLAMF6 o Ly-108), CD84, CD48 e CRACC (CD2-like receptor activating cytotoxic cells o CD319) [47-48-49]. Questi recettori regolano la citotossicità delle cellule NK, lo sviluppo delle cellule NKT, la stimolazione delle cellule T<sub>H</sub>2, lo switch isotipico e il mantenimento delle cellule secernenti anticorpi.

SLAM è una proteina transmembrana di 70 kDa caratterizzata da un dominio extracellulare composto da due motivi Ig-simili (mediante le interazioni omotipiche), un singolo dominio transmembrana e una lunga regione citoplasmatica caratterizzata da tre motivi consensus denominati ITSM (Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif-TxYxxV/I) contenenti residui di tirosina fosforilabili [50-51-52].

Il recettore SLAM ha una funzione di molecola co-stimolatoria, il cui segnale modula la secrezione di citochine di tipo T<sub>H</sub>1 o T<sub>H</sub>2 [52-53]. SLAM partecipa alla sinapsi immunologica in quanto viene reclutato in prossimità del TCR e fosforilato nei domini ITSM a seguito della stimolazione con anticorpi agonisti del solo TCR [51].

SAP è caratterizzato da due domini funzionali: un dominio SH2 in grado di legare fosfotirosine presenti sulle code citoplasmatiche dei recettori appartenenti alla famiglia SLAM; SAP lega questi siti con alta affinità e impedisce l’interazione con tirosine fosfatasi SHP-2 [47-49-54]. Il secondo dominio, invece, è in grado di legare la tirosina chinasi Fyn, che è richiesta per l’attivazione di SLAM [55-56] (Figura 2). Nel linfocita quiescente è presente, quindi, un complesso stabile

SLAM/SAP/FYN che in seguito alla stimolazione con anticorpi agonisti si modifica promuovendo la fosforilazione delle ITSM ed il reclutamento di altre molecole (effettore SHIP-1, adattatori Shc, Dok1, Dok2 e scambiatori guaninici RasGAP) [50-52]. Questo complesso multiproteico promuove la produzione di citochine in associazione con il segnale generato dal TCR: le vie di trasduzione del segnale utilizzate dai membri della famiglia di SLAM e dal TCR si sovrappongono e si rinforzano ampiamente per generare un'appropriate risposta immune.



**Figura 2**  
**Meccanismo di azione della proteina SAP**

L'importanza della segnalazione generata da SLAM e SAP nella regolazione della risposta immunitaria è emersa con l'identificazione di mutazioni di SAP in circa il 60% di pazienti affetti da XLP; il gene SAP presenta mutazioni che portano ad una completa perdita del gene o variazioni missenso che causano un arresto prematuro della sintesi proteica e/o una proteina non funzionale [57]. Sebbene alcune caratteristiche della XLP possano essere ricondotte a un deficit della citotossicità cellulo-mediata da parte di linfociti citotossici e NK, diversi studi "in vivo" e "in vitro" hanno mostrato difetti dei linfociti T, nella proliferazione e sintesi di interleuchine. I linfociti di pazienti XLP presentano, infatti, un deficit di proliferazione, di sintesi di IL-2, di espressione di CD25 e di aggregazione omotipica in seguito a stimolazione combinata del TCR e del CD28 [58]. Inoltre, i linfociti CD4<sup>+</sup> di pazienti XLP mostrano una minore espressione di ICOS e producono una quantità ridotta di IL-10, suggerendo che questi deficit siano la causa del mancato switch isotipico dei linfociti B e dell'ipogammaglobulinemia osservati negli stessi pazienti [59]. Mutazioni del gene sono state riscontrate, anche, in pazienti affetti da immunodeficienza comune variabile (CVID) e da FLH.

### **Background scientifico**

I pazienti affetti da ALPS e da FHL hanno in comune un quadro linfoproliferativo ed una maggior suscettibilità allo sviluppo di linfomi. 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 variazioni del gene di perforina (PRF1) possono influenzare lo sviluppo dell'ALPS [60]. Perforina è presente nei granuli litici dei linfociti CTL e delle cellule NK e svolge un ruolo importante nella citotossicità cellulo-mediata.

Negli ultimi anni, studi condotti su pazienti affetti da FHL hanno identificato variazioni nel gene UNC13D (Munc13-4) coinvolte nel deficit di secrezione di perforina [25].

Al fine di valutare un coinvolgimento della proteina Munc13-4 nello sviluppo del ALPS/DALD, sono state ricercate variazioni nucleotidiche nel gene UNC13D. Gli esoni e le regioni introniche adiacenti del gene UNC13D sono state sequenziate in 42 pazienti (22 ALPS e 20 DALD). In 9 pazienti, sono state identificate sette variazioni in eterozigosi in grado di determinare un cambio aminoacidico a livello della proteina. Due variazioni erano state già descritte in pazienti affetti da FHL (p.A59T c.175G>A, p.R928C c.2782C>T) [61-62] mentre due variazioni in pazienti affetti dalla Sindrome di Attivazione Macrofagica (MAS) (p.I848L c.2542A>C, p.A995P c.2983G>C) [63]. Tre variazioni, invece, non erano mai state identificate p.C112S (c.335G>C), p.V781I (c.2342G>A) e p.S923C (c.2768C>G). Le variazioni p.A59T, p.R928C erano presenti, rispettivamente, in cinque e otto controlli sani.

E' possibile ipotizzare che l'ALPS possa essere influenzato, anche, da geni coinvolti nella XLP (caratterizzata da suscettibilità alle infezioni da EBV). Una forma di XLP è causata da mutazioni nel gene SH2D1A codificante per la proteina SAP.

Il ruolo di SAP nell'autoimmunità non è ancora chiaro; tuttavia, alcuni studi hanno suggerito il suo coinvolgimento in alcune malattie autoimmuni (artrite reumatoide, sclerosi multipla) [64].

Komori et al. hanno mostrato che una mutazione nel gene SH2D1A può causare la perdita di espressione di SAP in topi *MRLlpr/lpr* che determina una parziale protezione dalla malattia indotta da *lpr* [65]; questo dato ha suggerito una relazione epistatica opposta tra i difetti del recettore Fas e SAP.

Al fine di valutare un coinvolgimento della proteina SAP nello sviluppo del ALPS/DALD, il promotore, gli esoni con le regioni introniche adiacenti e il 3' UTR del gene SH2D1A sono stati sequenziati in 31 pazienti maschi (poiché le malattie legate al cromosoma X hanno maggiore effetto nei maschi). Sono stati ritrovati tre SNP localizzati nella regione del promotore (-346C>T, -494G>A, -631G>A); i risultati hanno mostrato che i pazienti maschi mostravano una maggiore

frequenza degli alleli -346T e -631A rispetto i controlli (-346T: 61% vs 36% p=0.01; -631A: 61% vs 37% p=0.01). Nessuna differenza significativa era osservata per la variazione -494G>A.

La frequenza dei tre SNP nelle femmine (N=20), invece, era simile tra pazienti e controlli.

L'analisi con il software TESS (Transcription Element Search System<sup>2</sup>) ha permesso di osservare che i tre SNP identificati non erano in grado di modificare il sito di legame per i fattori trascrizionali. Tuttavia, l'allele -346C era riportato come sito di metilazione, suggerendo che la variazione -346C>T potesse influenzare l'espressione del gene.

### **Scopo del lavoro**

Scopo del mio lavoro è stato quello di identificare i geni coinvolti nella risposta citotossica dei linfociti CTL e delle cellule NK in grado di influenzare lo sviluppo del ALPS o DALD.

Il lavoro è stato focalizzato sui geni UNC13D e SHD2D1A che sono coinvolti nello sviluppo di malattie correlate alla FHL.

La prima parte del lavoro è stata quella di caratterizzare una mutazione identificata nel gene di Munc13-4 e valutarne gli effetti a livello cellulare e molecolare. Munc13-4 svolge un ruolo importante nel controllo della fusione delle vescicole con la membrana plasmatica; per questo motivo si è cercato di individuare alterazioni nell'espressione, nell'attività della proteina e nei meccanismi di migrazione-fusione delle vescicole con la membrana plasmatica.

La seconda parte, invece, è stata quella di valutare l'influenza della variazione -346C>T sull'espressione di SAP e il coinvolgimento della proteina nel favorire lo sviluppo del ALPS/DALD nell'uomo, al fine di confermare i dati ottenuti nei topi MRL $lpr/lpr$  [65].

---

<sup>2</sup> <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess>

# MATERIALI E METODI



minuti o incubate in assenza di stimolo. L'incubazione è stata bloccata centrifugando la sospensione per 1 minuto a 4°C. L'esocitosi dei granuli è stata valutata, in citofluorimetria, con l'analisi del marcatore CD63 (intensità media di fluorescenza tra cellule stimulate e non-stimate) [67].

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

### **Western Blotting**

Cellule HMC-1, dopo trasfezione, sono state lisate in un buffer di lisi (Tris-HCl 20 mM pH=7.4, Triton 1%, NaCl 150mM, EDTA 5mM, Glicerolo 10%) [67] contenente inibitori di proteasi (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, PMSF). Le proteine sono state analizzate con mAb  $\alpha$ -Sv5, mAb  $\alpha$ -actina (Sigma) e mAb  $\alpha$ -Rab27a (Santa Cruz). La rivelazione degli anticorpi primari è stato effettuata con un IgG mAb  $\alpha$ -mouse coniugato-HRP (GE, Healthcare, Usa). Le bande sono state quantificate mediante GelDoc EQ system (BioRad, Hercules, CA).

### **Immunoprecipitazione**

Cellule HMC-1 trasfettate e attivate sono state lisate in un buffer di lisi (Tris-HCl 20 mM pH=7.4, Triton 1%, NaCl 150mM, EDTA 5mM, Glicerolo 10%). La proteina Rab27a è stata immunoprecipitata con mAb  $\alpha$ -Rab27a (Santa Cruz); la membrana è stata **incubata** con un mAb  $\alpha$ -Sv5 (per rilevare Munc13-4) o mAb  $\alpha$ -Rab27a. La rivelazione degli anticorpi primari è stato effettuata con un IgG mAb  $\alpha$ -mouse coniugato-HRP (GE).

### **Analisi statistica**

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

# RISULTATI

---

### **Caratterizzazione della variazione c.2768G presente in un paziente ALPS: la mutazione non ha effetto sull'espressione della proteina Munc13-4**

La variazione p.S923C, riscontrata in un paziente affetto da ALPS-FAS, è stata identificata in posizione c.2768C>G nell'esone-29 del gene UNC13D. Il paziente presentava tre variazioni missense monoalleliche, una nel gene UNC13D, una nel gene BIRC4 (XIAP) e l'altra nel gene TNFRSF6 (FAS). Il quadro clinico mostrava splenomegalia, linfadenopatia, malattie autoimmuni, anemia e trombocitopenia. La funzione di Fas era difettiva mentre i linfociti DNT erano leggermente superiori ai valori di cut-off. Tutte le variazioni sono state ereditate dalla madre (eterozigote per ognuna delle mutazioni) che, tuttavia, presentava una funzione normale di Fas. Il padre, pur non avendo nessuna variazione, presentava un difetto nella funzione di Fas.

La complessità del quadro genetico della famiglia ha suggerito la caratterizzazione delle diverse variazioni riscontrate nel paziente; in particolare sarà descritto l'effetto della variazione c.2768G nel gene UNC13D.

La proteina Munc13-4 è espressa in diversi tipi di cellule soprattutto nelle cellule ematopoietiche [25-32]. Uno studio ha mostrato che Munc13-4 è coinvolta nella regolazione della secrezione dei lisosomi [32]. Per confermare gli effetti della mutazione in un modello utile, è stata scelta la linea di mastcellule HMC-1. Abbiamo clonato il cDNA codificante per la forma wild-type e per la forma mutata c.2768G (materiali e metodi). I costrutti sono stati trasfettati transientemente nelle cellule HMC-1 e, dopo 48 ore, è stata valutata l'espressione delle diverse forme in western blotting. L'anticorpo  $\alpha$ -Sv5 riconosceva una banda specifica a 120kDa che corrispondeva all'espressione della proteina Munc13-4.

Come mostrato dall'analisi in western blotting, le cellule trasfettate con i diversi costrutti esprimevano livelli simili di proteina. (Figura 3). Questo dato suggerisce che il polimorfismo c.2768G non è in grado di influenzare l'espressione della proteina.

### **La forma mutata di Munc13-4 non influenza 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 [31-35]. Alcuni studi, hanno dimostrato la co-presenza della proteina Munc13-4 con Rab27a sulle membrane delle vescicole (piastrine, linfociti T, NK, mastcellule) [29-32-36-44]. 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. L'anticorpo  $\alpha$ -Rab27a riconosceva una banda specifica a 25kDa che corrispondeva all'espressione della proteina Rab27a.

Come mostrato in figura 4, le cellule trasfettate con la forma wild-type di Munc13-4 esprimevano livelli di Rab27a comparabili a quelli delle cellule trasfettate con la forma c.2768G. Questi risultati suggeriscono che la forma mutata di Munc13-4 non è in grado di influenzare l'espressione della proteina Rab27a sulle membrane delle vescicole [32-44].

In seguito, al fine di valutare l'espressione di c.2768G e della proteina Rab27a in cellule attivate, è stato condotto un saggio di western blotting su lisati totali di cellule HMC-1 stimulate. Come mostrato in figura 5, l'espressione della forma mutata di Munc13-4 era sovrapponibile a quella ottenuta nelle cellule HMC-1 in assenza di stimolo (Figura 3). Inoltre, la proteina Rab27a mostrava livelli di espressione comparabili in tutte le condizioni di trasfezione come già osservato in cellule HMC-1 non-attivate (Figura 4).

### **Munc13-4 è un regolatore positivo della degranulazione in cellule HMC-1**

L'associazione tra la proteina Munc13-4 e Rab27a avviene 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 [25-32-36].

La funzione della proteina Munc13-4 è stata descritta nei linfociti CTL e nelle altre cellule del tessuto ematopoietico [32-34-44]. 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 [43]. 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 [32]. 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 [43]. Munc13-4 sembra, quindi, svolgere un ruolo importante nel controllo della degranulazione nelle mastcellule [32].

Al fine di definire l'effetto della mutazione sulla secrezione dei granuli, cellule HMC-1 sono state stimulate (48 ore dopo la trasfezione) con un peptide di origine batterica (fMLP) in grado di interagire con il suo recettore specifico (FPR1) sulla superficie delle cellule.

L'espressione del marcatore CD63 sulla membrana delle vescicole è stata valutata, dopo marcatura con un anticorpo  $\alpha$ -CD63, mediante analisi citofluorimetrica. L'espressione di CD63 nelle cellule di controllo non trasfettate è stata posta pari a 100. Come mostrato in figura 6A, l'espressione del marcatore CD63 era simile tra le cellule di controllo e le cellule trasfettate con la forma wild-type.

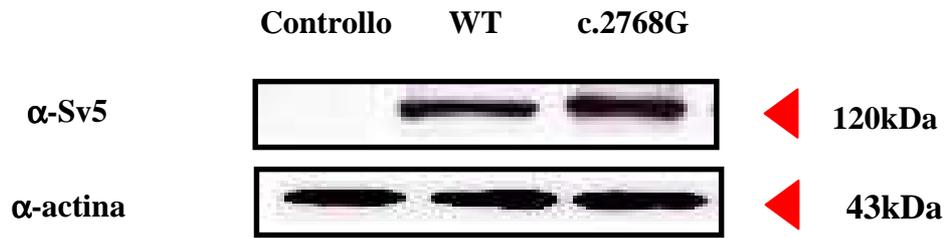
Le cellule trasfettate con il costrutto c.2768G, invece, hanno presentato una espressione leggermente inferiore rispetto a quella ottenuta nelle cellule trasfettate con il costrutto wild-type (Figura 6A-6B). Questi dati suggeriscono che la presenza della mutazione possa diminuire l'attività della proteina Munc13-

4 portando ad una minore fusione delle vescicole e, di conseguenza, l'aumento del loro numero a livello citoplasmatico. Questo esperimento conferma il ruolo di Munc13-4 nel controllo del processo di fusione [32-43-44].

**La variazione c.2768G determina una minore associazione tra la proteina Munc13-4 e Rab27a**

Come descritto in precedenza, l'associazione di Munc13-4 con la proteina Rab27a è importante nel processo di fusione dei granuli secretori con la membrana plasmatica [24-25-32]. Al fine di valutare gli effetti della mutazione sull'interazione tra le proteine Munc13-4/Rab27a, è stato condotto un saggio di immunoprecipitazione su lisati totali di cellule HMC-1 trasfettate. La proteina Rab27a è stata immunoprecipitata con un mAb  $\alpha$ -Rab27a; l'associazione di Munc13-4 è stata valutata con un mAb  $\alpha$ -Sv5. Come mostrato nella figura 7, la forma wild-type di Munc13-4 co-precipitava una quantità maggiore di Rab27a rispetto alla forma mutata c.2768G. L'associazione tra la proteina Rab27a e Munc13-4 wild-type dava origine ad un segnale più intenso rispetto a quello osservato con la forma c.2768G (Figura 7A-7B). Questo risultato suggerisce che la forma mutata c.2768G può essere in grado di influenzare, in modo negativo, l'associazione tra le proteine Munc13-4 e Rab27a.

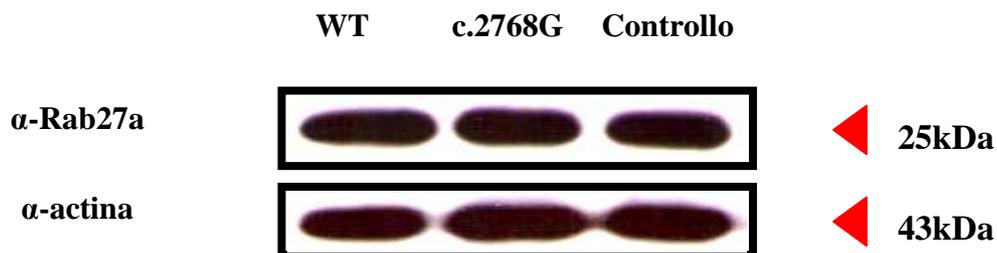
La variazione è presente nel dominio MHD coinvolto nella localizzazione di Munc13-4 sulla membrana delle vescicole [32-44]; è possibile ipotizzare che la forma mutata possa influenzare il processo di fusione delle vescicole secretorie con la membrana plasmatica.



**Figura 3**

**Western Blotting di lisati cellulari ottenuti da cellule HMC-1 trasfettate**

Cellule HMC-1 non trasfettate (Controllo); costrutto contenente il cDNA della forma wild-type Munc13-4 (WT); costrutto contenente il cDNA della forma mutata c.2768G. L'analisi è compiuta 48 ore dopo la trasfezione. La rilevazione è effettuata con mAb  $\alpha$ -Sv5 (120kDa); la normalizzazione è verificata tramite mAb  $\alpha$ -actina (43kDa).

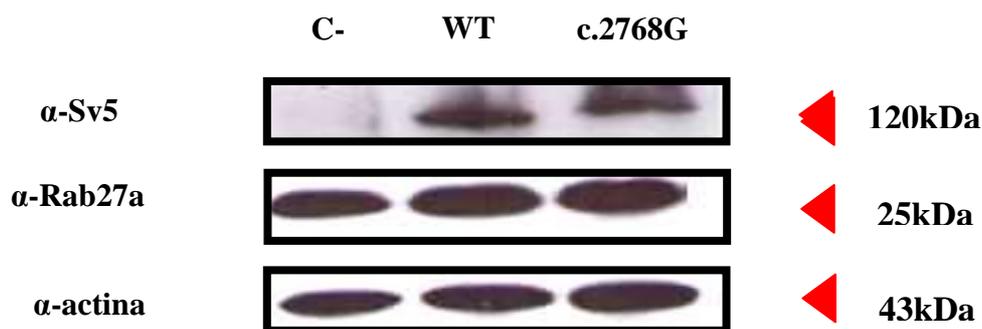


**Figura 4**

**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 della forma mutata c.2768G. L'analisi è compiuta 48 ore dopo la trasfezione.

La rilevazione è effettuata con mAb  $\alpha$ -Rab27a (25kDa). La normalizzazione è verificata tramite mAb  $\alpha$ -actina (43kDa).

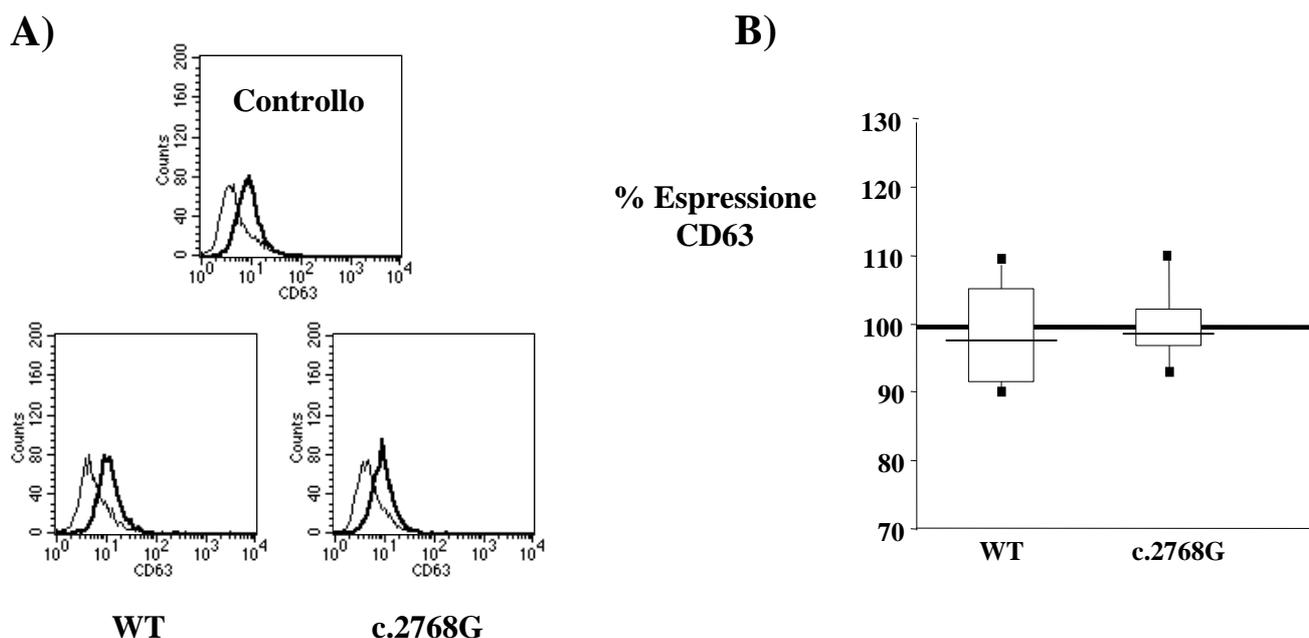


**Figura 5**

**Espressione di Munc13-4 e Rab27a in lisati cellulari ottenuti da 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 della forma mutata di Munc13-4. Le cellule, in seguito, sono stimulate con  $10^{-4}$  M fMLP per 10 minuti; la reazione è bloccata centrifugando la sospensione per 1 minuto a  $4^{\circ}\text{C}$ .

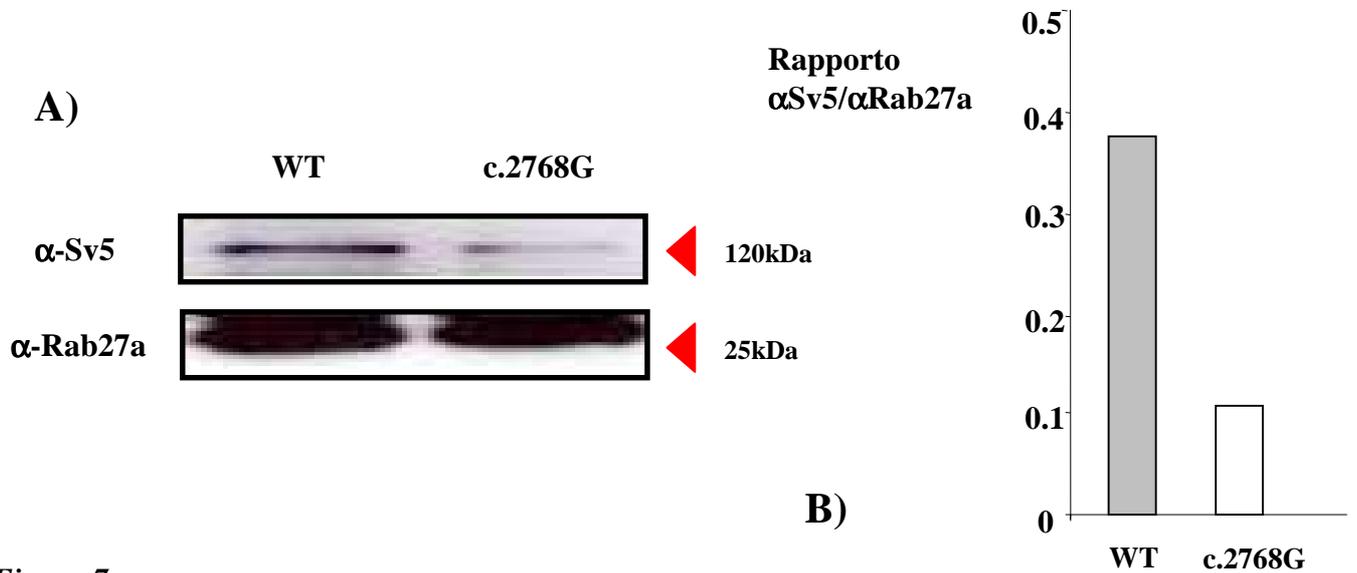
La rilevazione è effettuata con mAb  $\alpha$ -Sv5 (120kDa) e  $\alpha$ -Rab27a (25kDa). La normalizzazione è verificata tramite mAb  $\alpha$ -actina (43kDa).



**Figura 6**

**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 della forma mutata di Munc13-4. Le cellule sono stimulate con fMLP ( $10^{-4}$ M). **(A)** Cellule di controllo non-stimate (linea sottile); cellule trasfettate e stimulate (linea spessa). L'espressione di CD63 sulle membrane delle vescicole è valutata con un mAb  $\alpha$ -CD63 coniugato FITC. **(B)** Espressione di CD63 in cellule trasfettate con i diversi costrutti (cellule non-trasfettate sono poste uguale a 100%). La linea orizzontale indica il valore medio, il box-plot l'intervallo di interquartile, la linea verticale i valori massimo/minimo.



**Figura 7**

**Associazione di Munc13-4 con la proteina Rab27a**

(A) Immunoprecipitazione di Munc13-4 con la forma attiva di Rab27a in lisati di cellule HMC-1 trasfettate con i diversi costrutti. La proteina Rab27a è immunoprecipitata da lisati cellulari con un mAb  $\alpha$ -Rab27a. L'immunoprecipitato è analizzato in western blotting mediante un mAb  $\alpha$ -Sv5; la normalizzazione è verificata tramite un mAb  $\alpha$ -Rab27a.

(B) L'istogramma mostra l'analisi densitometrica espressa come rapporto tra le bande Sv5 e Rab27a

# DISCUSSIONE

---

I pazienti affetti dalla Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa 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 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 variazioni del gene di perforina possono influenzare lo sviluppo dell'ALPS [60]. Inoltre, negli ultimi anni, studi condotti su pazienti affetti da FHL hanno identificato variazioni nel gene UNC13D coinvolte nel deficit di secrezione di perforina [25]. Questo ha suggerito che la proteina Munc13-4 potesse concorrere allo sviluppo dell'ALPS.

Al fine di indagare questa ipotesi, sono state ricercate variazioni nucleotidiche nel gene UNC13D in pazienti affetti da ALPS/DALD. Il sequenziamento del gene UNC13D ha portato all'identificazione di sette variazioni missenso in eterozigosi. Quattro variazioni sono state già descritte in pazienti affetti da FHL (p.A59T, p.R928C) [61-62] e in pazienti affetti da MAS (p.I848L, p.A995P) [63]. Tre variazioni, invece, non sono mai state identificate: p.C112S, p.V781I e p.S923C. Quest'ultima mutazione è stata identificata in eterozigosi in un paziente affetto da ALPS-FAS; il paziente presentava, anche, due variazioni missenso monoalleleliche nel gene BIRC4 e nel gene TNFRSF6. L'analisi del quadro genetico della famiglia ha mostrato che le mutazioni erano state ereditate tutte dalla madre; il padre era sano ma presentava un difetto nella funzione di Fas. La complessità di questo quadro ha condotto alla caratterizzazione della variazione p.S923C del gene UNC13D. La variazione in posizione c.2768C>G, nell'esone-29, determina un cambio aminoacidico con una sostituzione del codone CTG (codificante per una serina) con il codone TGT (codificante per una cisteina). La mutazione è presente nella regione MHD coinvolta nella localizzazione della proteina sulle membrane delle vescicole.

Abbiamo voluto valutare gli effetti della mutazione a livello cellulare e molecolare. Il primo dato ottenuto dai nostri esperimenti è stato che la variazione non altera l'espressione della proteina Munc13-4. Questo è stato dimostrato con la trasfezione, nella linea mastocitaria HMC-1, dei plasmidi contenenti il cDNA per la forma wild-type e mutata della proteina. L'analisi in western blotting ha mostrato che i costrutti sono espressi allo stesso livello; il polimorfismo non ha effetto sull'espressione di Munc13-4.

Molti studi hanno cercato di identificare i fattori coinvolti nel processo di secrezione dei granuli [29-30-32-43-44]. 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 [29-32-44]. Pertanto, al fine di verificare gli effetti della mutazione 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.

I risultati ottenuti hanno mostrato una espressione sovrapponibile della proteina Rab27a tra le cellule trasfettate con i diversi costrutti di Munc13-4. L'insieme di questi dati suggerisce l'incapacità di Munc13-4 nel modulare l'espressione di Rab27a sulla membrana delle vescicole.

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 [44]. In contrasto con questo modello, uno studio ha suggerito la presenza costitutiva di Rab27a e Munc13-4 sulla membrana delle vescicole nelle cellule ematopoietiche [32]. Questi dati suggeriscono una reciproca dipendenza tra Rab27a e Munc13-4.

La mutazione c.2768G è presente nel dominio MHD importante per la localizzazione della proteina sui lisosomi. Questo permette di ipotizzare che il dominio possa essere coinvolto 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 [24-25-32]. 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 della forma mutata di Munc13-4 e della proteina Rab27a in cellule attivate, le cellule HMC-1 sono state trasfettate e, in seguito, stimulate con il peptide fMLP. I risultati hanno mostrato che l'espressione delle forma mutata di Munc13-4 era sovrapponibile a quella ottenuta nelle cellule HMC-1 in assenza di stimolo. Inoltre, la proteina Rab27a mostrava livelli di espressione comparabili in tutte le condizioni di trasfezione come osservato, precedentemente, nelle cellule non-attivate.

Il processo di fusione delle vescicole con la membrana plasmatica e la secrezione del loro contenuto è stato descritto in diversi lavori [26-29-44]. 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 ed è coinvolta nel controllo della degranulazione [32]. La stimolazione delle mastcellule conduce alla migrazione delle vescicole verso la membrana plasmatica e determina un aumento del marcatore CD63 sulla superficie delle

cellule [43]. Pertanto, per definire l'effetto della mutazione sulla secrezione dei granuli, cellule HMC-1 sono state stimulate con il peptide fMLP. L'analisi è stata compiuta valutando l'espressione di CD63 sulla membrana delle vescicole; le cellule trasfettate con il costrutto c.2768G hanno presentato una espressione leggermente inferiore rispetto a quella ottenuta nelle cellule trasfettate con il costrutto wild-type. Questi dati suggeriscono che la presenza della mutazione possa influenzare l'attività della proteina Munc13-4 ma non sia in grado di alterare il processo di fusione. E' possibile ipotizzare una capacità della proteina Munc13-4 endogena di compensare l'attività della forma mutata e di ripristinare la normale esocitosi.

Come descritto in precedenza, il coinvolgimento di Munc13-4 nel processo di fusione dei granuli secretori è mediato dalla sua interazione con Rab27a. Pertanto, per valutare se la variazione possa influenzare tale associazione, è stato effettuato un saggio di immunoprecipitazione. I risultati hanno mostrato che il legame tra Rab27a e la forma mutata di Munc13-4 era inferiore rispetto a quello ottenuto con la forma wild-type. Questo dato suggerisce che la variazione c.2768G è in grado di influenzare negativamente il legame tra le due proteine. Tuttavia, questa minor associazione non è sufficiente per impedire il processo di fusione dei granuli, come mostrato dall'analisi del marcatore CD63.

Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano che la mutazione riscontrata sul gene UNC13D non conduce ad un cambiamento dell'espressione della proteina Munc13-4. La variazione identificata nel dominio MHD non sembra in grado di alterarne l'attività; infatti la forma mutata c.2768G non influenza l'espressione della proteina Rab27a sulle membrane delle vescicole esocitiche. I risultati confermano il coinvolgimento della proteina Munc13-4 nel controllo della fase di fusione delle vescicole alla membrana plasmatica. L'associazione tra la forma mutata di Munc13-4 e Rab27a mostra un legame inferiore rispetto alla forma wild-type; tuttavia, questa minor associazione non è sufficiente ad impedire il processo di fusione dei granuli. La proteina Munc13-4 sembra essere, quindi, una chiave del meccanismo di regolazione della fusione; una alterazione della sua struttura potrebbe condurre ad una diminuzione della sua espressione proteica e funzione effettrice.

# MATERIALI E METODI

## Sezione2

### **Pazienti**

Sono stati analizzati 27 pazienti affetti da ALPS (15 maschi, 12 femmine) e 24 pazienti con DALD (16 maschi, 8 femmine). La diagnosi della malattia è stata effettuata secondo i criteri indicati nel ALPS NIH International Workshop [17].

### **Cellule**

Cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state isolate da sangue mediante separazione su gradiente di Ficoll (Lympholyte-H, Cedarlane Laboratories, Olanda). Per valutare l'espressione di SAP e la metilazione di -346C, PBMC sono stati stimolati con 1µg/ml di PHA (Sigma-Aldrich) in terreno RPMI addizionato di 10 mM HEPES, 1% L-Glutamina, 1X Antibiotici e 10% FBS in presenza di 10U/ml IL-2 (Sigma-Aldrich). Dopo 3-5 giorni di coltura, cellule CD16<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> sono state purificate positivamente con biglie magnetiche (Miltenyi Biotec, GmbH, Germania) e analizzate per l'espressione di SAP. In alcuni esperimenti, linfociti T CD8<sup>+</sup> e cellule NK CD56<sup>+</sup> sono stati purificati da PBMC mediante il kit RosetteSep<sup>®</sup> Human CD8<sup>+</sup>T/NK Cell Enrichment Cocktail (Stem Cell technologies, Vancouver, Canada). In entrambe le purificazioni, le cellule sono state messe in coltura come descritto sopra.

### **Analisi della metilazione**

I campioni di Dna sono stati inviati a Roma per l'analisi dei livelli di metilazione. I campioni sono stati modificati con bisolfito di sodio mediante il kit Bisulphite CT Conversion (EZ DNA Methylation-Gold kit-Zymo Research, Irvine, CA) seguendo le indicazioni del produttore.

La regione contenente lo SNP di interesse è stato amplificata mediante PCR con specifici primer, uno dei quali biotinilato. L'amplicone è stato sequenziato con il sistema Pyrosequencer PyroMark ID (Biotage AB-Biosystems, Uppsala, Svezia). Un primer specifico è stato utilizzato per il sequenziamento con Real Time.

### **Real-Time RT-PCR**

L'Rna totale di PBMC è stato isolato mediante Trizol (Invitrogen). 500ng di Rna sono stati retrotrascritti con ThermoScript RT PCR System (Invitrogen). L'espressione di SAP è stata valutata con un saggio di espressione genica (SAP: saggio N° Hs00158978\_m1; Applied Biosystem, Foster City, CA). Il gene housekeeping GAPDH (saggio N° Hs99999905\_m1) è stato usato per normalizzare la quantità di cDNA. La Real Time PCR, in duplicato per ciascun campione, è stata effettuata mediante il 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem). I risultati sono stati analizzati con il metodo Delta-Delta CT.

### **Western Blotting**

Le cellule sono state lisate in un buffer di lisi (Tris-HCl 20 mM pH=8.0, Triton 1%, NaCl 150mM, EDTA 5mM, NP-40 0.5%) contenente inibitori di proteasi (Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina, PMSF). Le proteine sono state analizzate con mAb  $\alpha$ -SAP (Upstate, Lake Placid, NY) e un mAb  $\alpha$ -actina (Sigma). La rivelazione degli anticorpi primari è stato effettuata con un IgG mAb  $\alpha$ -mouse coniugato-HRP (GE). Le bande sono state quantificate mediante GelDoc EQ system (BioRad, Hercules, CA).

### **Analisi statistica**

L'analisi statistica della distribuzione allelica e genotipica è stata effettuata con il test Chi-quadro applicando la correzione di Yates. I dati funzionali sono stati analizzati con il test U di Mann-Whitney ( $p < 0.05$ ).

# RISULTATI

---

## Sezione2

**Lo SNP -346C nel promotore del gene SH2D1A è metilato del 30% in tutti i soggetti**

L'analisi con il software TESS ha mostrato che i tre SNP identificati nel gene SH2D1A non erano in grado di modificare i siti di legame per i fattori trascrizionali. Tuttavia, lo SNP -346C era riportato come sito di metilazione; questo dato ha suggerito che la variazione -346C>T fosse in grado di influenzare l'espressione del gene. Alcuni studi hanno dimostrato che la differente metilazione di SH2D1A può correlare con il suo livello di trascrizione in diversi tipi cellulari [68]. Per valutare il coinvolgimento dell'allele -346C nella metilazione del gene di SAP, abbiamo valutato lo stato di metilazione dello SNP in PBMC di soggetti sani mediante una PCR metilazione-specifica. L'allele -346C era metilato di circa il 30% in tutti i soggetti (dato non mostrato); questo dato suggerisce un coinvolgimento dell'allele nella regolazione dell'espressione di SAP.

**I portatori dell'allele -346T mostrano alti livelli di Rna messaggero**

Il software TESS e la PCR metilazione-specifica hanno mostrato la metilazione dell'allele -346C.

In seguito, al fine di valutare l'influenza della variazione -346C>T sull'espressione della proteina, abbiamo analizzato i livelli di Rna messaggero (mRna) di SAP.

PBMC di soggetti maschi sani sono stati sottoposti a PCR quantitativa dopo 3 giorni di coltura con PHA+IL-2 (in condizioni basali l'espressione di SAP è scarsa). Come mostrato in figura 8, i soggetti portatori dell'allele -346T producevano più alti livelli di mRna rispetto ai soggetti portatori dell'allele -346C. Inoltre, per verificare gli effetti della variazione nucleotidica nelle singole popolazioni cellulari, è stata effettuata una purificazione positiva con biglie magnetiche di cellule NK (CD16<sup>+</sup>), linfociti T helper (CD4<sup>+</sup>), T citotossici (CD8<sup>+</sup>) da PBMC in coltura. I risultati hanno mostrato che la variante -346T conduceva ad un maggiore livello di mRna nelle cellule CD16<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> come osservato nei PBMC. Nelle cellule CD4<sup>+</sup> la differenza non era significativa (Figura 8).

Il processo di purificazione condotto su PBMC ha permesso di ottenere le diverse popolazioni cellulari. Tuttavia, i risultati ottenuti impediscono di stabilire se l'aumento di mRna sia influenzato dai due alleli o dal metodo di purificazione utilizzato.

Al fine di verificare e confermare i dati ottenuti, le cellule NK e linfociti T CD8<sup>+</sup> di soggetti maschi sani sono stati purificati negativamente mediante la tecnica delle Rosette (materiali e metodi). L'analisi con PCR quantitativa ha confermato un alto livello di mRna nei soggetti portatori dell'allele -346T rispetto ai soggetti portatori dell'allele -346C in PBMC, cellule NK e linfociti T CD8<sup>+</sup> (Figura 9). L'analisi con una PCR metilazione-specifica ha mostrato che l'allele -346C era più metilato dell'allele -346T (come già osservato in precedenza). I PBMC mostravano una metilazione più alta rispetto alle cellule NK e linfociti

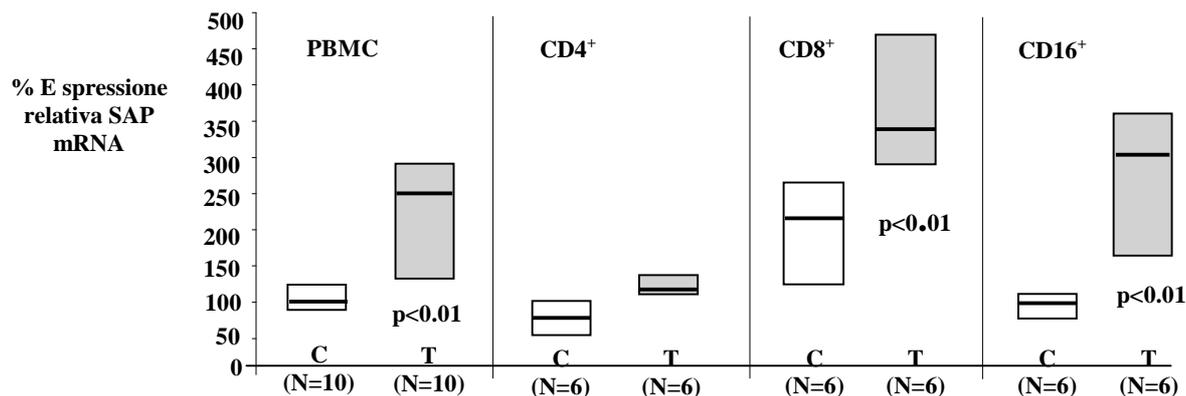
T CD8<sup>+</sup> (Figura 10). Questi dati suggeriscono la capacità degli alleli di correlare con livelli differenti di trascrizione a seconda del loro grado di metilazione.

**I pazienti ALPS/DALD portatori dell'allele -346T mostrano maggiori livelli di mRNA di SAP**

Al fine di confermare i dati ottenuti, abbiamo effettuato un'analisi quantitativa dell'mRna di SAP ottenuto da PBMC attivati di pazienti ALPS/DALD. I risultati hanno mostrato che i pazienti portatori dell'allele -346T (N=3) mostravano più alti livelli di mRNA rispetto ai pazienti con l'allele -346C (N=3), confermando i dati ottenuti nei controlli maschi (dato non mostrato). L'analisi della metilazione, inoltre, ha mostrato che l'allele -346C era metilato (24%) nei pazienti portatori della variante -346C (dato non mostrato). L'insieme di questi risultati rafforzano l'ipotesi di una correlazione tra livelli di trascrizione e i due alleli; in particolare l'allele -346T conduce ad un maggiore quantità di mRNA di SAP.

**I portatori dell'allele -346T mostrano una maggiore espressione della proteina SAP**

I soggetti portatori dell'allele -346T hanno mostrato un incremento del livello di mRNA rispetto ai soggetti con l'allele -346C. Al fine di valutare se questa differenza era rilevabile a livello proteico, è stato condotto un saggio di western blotting su lisati totali di PBMC di soggetti maschi sani. I PBMC sono stati messi in coltura con PHA+IL-2. L'anticorpo  $\alpha$ -SAP riconosceva la proteina con una banda specifica a 17kDa. Come mostrato in figura 11A-B, i soggetti portatori dell'allele -346T esprimevano una maggiore quantità della proteina SAP rispetto alle cellule di soggetti con -346C. Questi risultati suggeriscono che -346T è associato ad un aumento dell'espressione proteica di SAP; tale aumento potrebbe favorire lo sviluppo della linfoproliferazione nei pazienti ALPS/DALD portatori dell'allele.

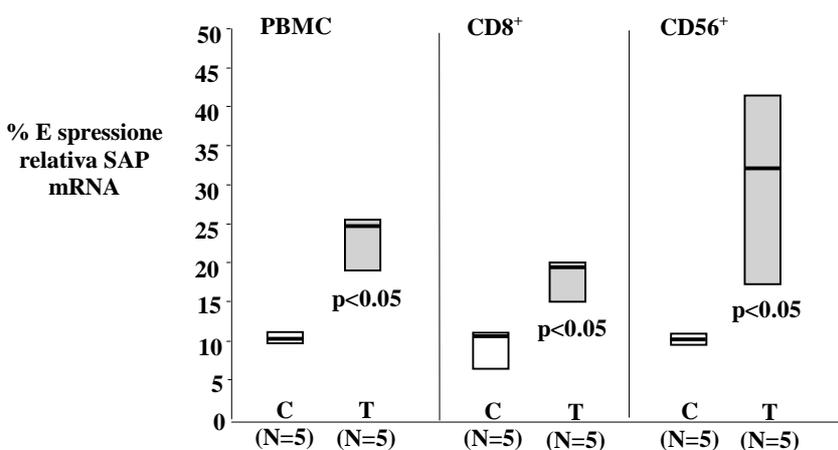
**Figura 8****Espressione dell'mRna di SAP**

Analisi dell'espressione di SAP a livello dell'mRna in PBMC, cellule NK (CD16<sup>+</sup>), linfociti T citotossici (CD8<sup>+</sup>) e linfociti T Helper (CD4<sup>+</sup>) derivate da soggetti sani portatori degli alleli -346C o -346T.

Le cellule sono purificate positivamente da PBMC attivati (-346C: N=6, -346T: N=6).

La quantificazione dell'mRna di SAP è valutata tramite Real time PCR.

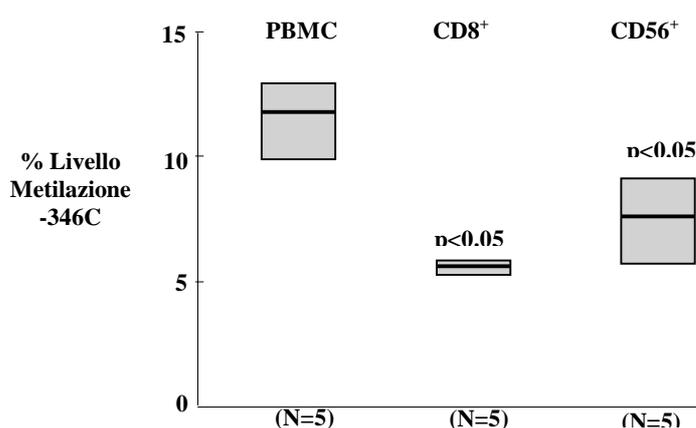
Il livello medio di espressione dei campioni -346C è posto come 100%; la linea orizzontale indica il valore medio, il box-plot l'intervallo di interquartile. Analisi statistica con test U di Mann-Whitney.

**Figura 9****Espressione dell'mRna di SAP**

PBMC, linfociti T citotossici (CD8<sup>+</sup>), cellule NK (CD56<sup>+</sup>) di soggetti maschi sani portatori degli alleli -346C (N=5) o -346T (N=5).

Quantificazione dell'Rna messaggero di SAP mediante Real time PCR come in figura 8. La linea orizzontale indica il valore medio, il box-plot l'intervallo di interquartile.

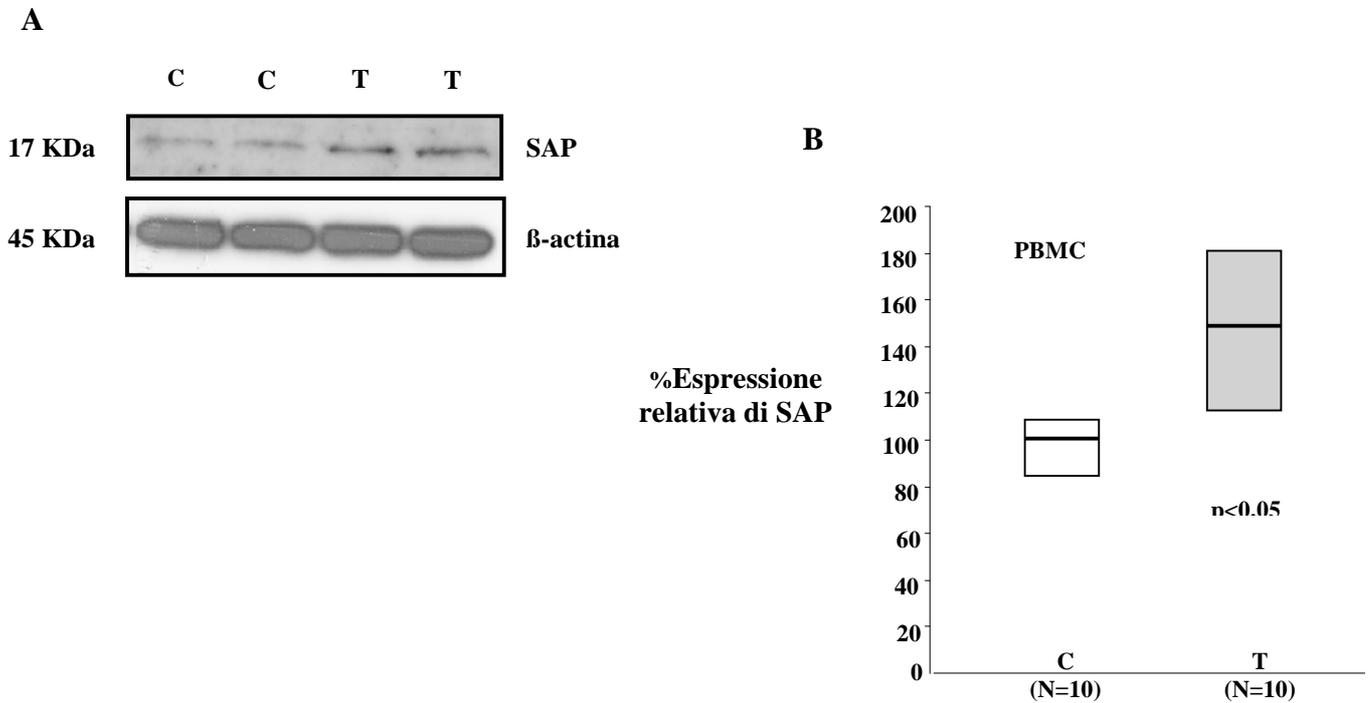
Analisi statistica con test U di Mann-Whitney.

**Figura 10****Analisi quantitativa della metilazione**

Metilazione del Dna a livello della variazione -346C>T. Il livello di metilazione è espresso come percentuale relativa delle C metilate non-convertite (C%) rispetto alle C metilate convertite (T%).

La linea orizzontale indica il valore medio, il box-plot l'intervallo di interquartile.

Analisi statistica con test U di Mann-Whitney.



### Figura 11

#### Espressione della proteina SAP

(A) Espressione proteica di SAP in PBMC derivati da soggetti maschi sani portatori degli alleli -346C (N=2) o -346T (N=2). La rilevazione è effettuata con mAb  $\alpha$ -SAP (17kDa). La normalizzazione è verificata tramite mAb  $\alpha$ -actina (43kDa). (B) Analisi densitometrica della espressione proteica di SAP in PBMC da soggetti maschi sani portatori degli alleli -346C (N=10) o -346T (N=10)

Il valore 100% indica l'espressione della mediana in soggetti portatori della variazione -346C; la linea orizzontale indica il valore medio, il box-plot l'intervallo di interquartile.

Analisi statistica con test U di Mann-Whitney.

# DISCUSSIONE

---

Sezione2

I pazienti affetti dalla Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa 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 e in alcune di esse i geni mutati sono sconosciuti. L'associazione tra autoimmunità e Fas è stata individuata nei modelli murini MRL *lpr/lpr* e *gld/gld*, caratterizzati, rispettivamente, da mutazioni a carico del gene di Fas e FasL [10-11]. Nel nostro laboratorio è stata descritta una forma incompleta di ALPS denominata DALD. Questi pazienti non presentano mutazioni in Fas, FasL o caspasi-10; i genitori sono sani anche se mostrano un difetto nella funzione di Fas. L'espressione della malattia potrebbe dipendere dal tipo e dalla gravità delle mutazioni e/o co-presenza di più mutazioni o polimorfismi a carico della via di trasduzione del segnale di Fas. In precedenti lavori è stato suggerito che variazioni nei geni di osteopontina e perforina possono essere associate con ALPS e DALD [60]. Uno studio ha mostrato che una mutazione nel gene SH2D1A può causare la perdita di espressione di SAP in topi MRL*lpr/lpr* determinando una parziale protezione dalla malattia indotta da *lpr* [65]; questo dato ha suggerito una relazione epistatica opposta tra i difetti del recettore Fas e SAP.

Al fine di valutare un coinvolgimento della proteina SAP nello sviluppo dell'ALPS/DALD, il promotore, gli esoni con le regioni introniche adiacenti e il 3' UTR del gene SH2D1A sono stati sequenziati in soggetti maschi, dato che le malattie legate al cromosoma X hanno maggiore effetto nel sesso maschile. Sono stati identificati tre SNP tutti localizzati nel promotore del gene SH2D1A. L'analisi mediante il software TESS ha mostrato che le tre variazioni non modificavano i siti di legame per fattori trascrizionali; lo SNP -346C, invece, era riportato come sito di metilazione suggerendo una capacità della variazione -346C>T di influenzare l'espressione del gene SH2D1A. Il nostro lavoro è stato focalizzato su quest'ultima variazione.

Il primo dato ottenuto dai nostri esperimenti è stato che l'allele -346C è metilato di circa il 30% in tutti i soggetti portatori. Questo è stato dimostrato mediante una PCR metilazione-specifica.

Il secondo dato è emerso dall'analisi quantitativa dell'mRna di SAP in cellule NK e linfociti T CD8<sup>+</sup>. I soggetti portatori dell'allele -346T esprimono alti livelli di mRNA rispetto ai soggetti emizigoti per -346C. Questi dati hanno permesso di ipotizzare una capacità degli alleli di correlare con livelli differenti di trascrizione a seconda del loro grado di metilazione come già osservato in un altro studio [68].

I soggetti portatori dell'allele -346T mostrano un incremento del livello di mRNA rispetto ai soggetti con l'allele -346C. Al fine di valutare se questa differenza era rilevabile a livello proteico, è stato condotto un saggio di western blotting su lisati totali di PBMC. I risultati ottenuti nei soggetti maschi portatori della variante -346T hanno mostrato una maggiore quantità della proteina di SAP

rispetto ai soggetti con l'allele -346C e i soggetti di controllo. L'insieme di questi dati suggeriscono un coinvolgimento dell'allele -346T nello sviluppo dell'ALPS/DALD; l'aumento di espressione della proteina può essere un fattore predisponente alla malattia. La maggiore frequenza dell'allele -346T nei maschi rispetto alle femmine ha permesso di ipotizzare una associazione della malattia con il sesso maschile, come già ha mostrato in uno studio sull'ALPS [69].

I pazienti affetti da ALPS e DALD mostrano entrambi un difetto nella funzione di Fas ma soltanto nell'ALPS è presente l'espansione dei linfociti DNT. Nonostante questa differenza, questo lavoro mostra un background genetico molto simile tra le due malattie; variazioni nel gene di SAP, e come già suggerito perforina e osteopontina [60], influenzano l'ALPS e DALD.

Lavori precedenti hanno mostrato che variazioni nei geni di osteopontina e perforina sono in grado di inibire e influenzare, rispettivamente, l'AICD e l'attività citotossica dei linfociti [60]. Tuttavia, questi meccanismi non sono coinvolti nell'effetto predisponente dell'allele -346T poiché questa variazione è associata all'aumento dell'espressione di SAP che, invece, è importante nella funzione citotossica e nell'AICD [70].

I livelli di espressione di SAP non influenzano la funzione di Fas; l'AICD e l'apoptosi indotta da Fas è paragonabile nei soggetti maschi sani portatori dei due alleli (dato non mostrato).

L'aumento della proteina SAP favorisce la co-stimolazione linfocitaria che determina un incremento della linfoproliferazione; questo insieme al difetto della funzione di Fas compromette la capacità di eliminare le cellule attivate. L'effetto può essere mediato, soprattutto, dal recettore 2B4 (recettore di attivazione per NK e CD8<sup>+</sup>) che favorisce l'attivazione delle cellule citotossiche e la secrezione di IFN $\gamma$  dato che l'effetto dello SNP -346C>T, sull'espressione di SAP, è osservato nelle cellule NK e nei linfociti T CD8<sup>+</sup>. Tuttavia, questi dati non possono escludere il coinvolgimento di altri membri della famiglia SLAM che sono stati già descritti in altre malattie autoimmuni [49].

In conclusione, questo lavoro mostra che pazienti affetti da ALPS e DALD presentano una elevata frequenza dell'allele -346T, identificato nel promotore del gene SH2D1A, che causa la perdita del sito di metilazione -346C. Questo determina un aumento dell'espressione di SAP nelle cellule NK e nei linfociti T CD8<sup>+</sup> che può favorire lo sviluppo di linfoproliferazione. E' possibile ipotizzare, in futuro, l'utilizzo di farmaci in grado di inibire SAP al fine di controllare l'evoluzione di queste malattie.

# PROSPETTIVE FUTURE

Lo scopo della prima parte di questo lavoro era quello di caratterizzare una mutazione individuata nel gene UNC13D in un paziente affetto da ALPS-FAS e valutare il coinvolgimento di Munc13-4 nello sviluppo della malattia. Lo studio ha permesso di dimostrare che la variazione riscontrata non determina un cambiamento dell'espressione della proteina Munc13-4. Tale mutazione non sembra in grado di alterare l'attività della proteina che, normalmente, agisce durante il processo di secrezione; l'associazione tra la forma mutata di Munc13-4 e Rab27a mostra un legame inferiore rispetto alla forma wild-type. Tuttavia, questa minor associazione non è sufficiente ad impedire il processo di fusione dei granuli.

Studi futuri permetteranno di indagare, ulteriormente, i meccanismi del processo di secrezione.

Un obiettivo sarà quello di caratterizzare le altre mutazioni riscontrate nei pazienti ALPS/DALD e valutarne gli effetti nel processo di secrezione e 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 dell'ALPS.

La seconda parte del lavoro aveva lo scopo di valutare l'influenza della variazione -346C>T, individuata nel gene SH2D1A, sull'espressione di SAP e sullo sviluppo dell'ALPS/DALD nell'uomo, al fine di confermare i dati ottenuti nei topi *MRL<sup>lpr/lpr</sup>*. Lo studio ha permesso di dimostrare che pazienti affetti da ALPS/DALD presentano una elevata frequenza dell'allele -346T che causa la perdita del sito di metilazione -346C. Questo determina un aumento dell'espressione di SAP nelle cellule NK e nei linfociti T CD8<sup>+</sup> che può favorire lo sviluppo di linfoproliferazione.

Obiettivo futuro sarà quello di valutare gli effetti della variazione -346C>T sulla proliferazione linfocitaria e sulla secrezione citochinica. Questo potrebbe chiarire gli effetti della proteina SAP nello sviluppo della malattia.

# BIBLIOGRAFIA

1. Goldsby R., A., Kindt T., J., Osborne B., A. (2005) *Kuby 2/e*, 473-521
2. Brenner D., Krammer P., H., Arnold R. (2008) *Oncology Ematology* **66**, 52-64
3. Mateo V., Menager M., Saint-Basile G., Stoizenberg M., C., Roquelaure B., Andrè N., Florkin B., Deist F., Picard C., Fischer A., Rieux-Laucat F. (2007) *Blood* **110**, 4285-4292
4. Dianzani U., Chiocchetti A., Ramenghi U. (2002) *Life Sciences* **72**, 2803-2824
5. Cho S., C., Choi E., J. (2002) *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 24-27
6. Los M., Stroh C., Janicke R., U., Engels I., H., Schulze-Osthoff K. (2001) *Trends in Immunology* **22**, 31-34
7. 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
8. Pop C., Timmer J., Sperandio S., Salvesen G., S. (2006) *Molecular Cell* **22**, 269-275
9. Nishida K., Yamaguchi O., Otsu K. (2008) *Circulation Research* **103**, 343-351
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. Rieux-Laucat F., Le Deist F., Fischer A. (2003) *Cell Death and Differentiation* **10**, 124-133
15. Lamkanfi M., Festjens N., Declercq W., Berghe T., V., Vandenabeele P. (2007) *Nature* **14**, 44-55
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., Blessing JJ., Dianzani U., Fleisher TA., Jaffe ES., Lenardo MJ., Rieux-Laucat F., Siegel RM., Su HC., Teachey DT., Rao VK. (2010) *Blood*
18. 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
19. 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
20. Kopecky O., Lukesova S. (2007) *International Journal of Immunogenetics* **34**, 225-229
21. Brandt D., Gershwin M., E. (2006) *Autoimmunity Reviews* **5**, 465-470
22. 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
23. Menasche G., Pastural E., Feldmann J., Certain S., Ersoy F., Dupuis S. (2000) *Nature Genetic* **25**, 173-176
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. Morra M., Silander O., Calpe S., Choi M., Oettgen H., Myers L., Etzioni A., Buckley R., Terhorst C. (2001) *Blood* **98** 1321-1325
28. Engel P., Eck MJ., Terhorst C. (2003) *Nat Rev Immunol* **3** 813-821
29. Shirakawa R., Higashi T., Tabuchi A., Yoschioka A., Nischioka H., Horiuschi H. (2004) *The Journal of Biological Chemistry* **11** 10730-10737

30. 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
31. Tsuboi T., Fukuda M. (2006) *Journal of Cell Science* **119** 2196-2203
32. Neef M., Wieffer M., Jong A., Negroiu G., Metz C., van der Sluijs P. (2005) *Molecular Biology of the Cell* **16** 731-741
33. Lee M., Mishra A., Lambright D. (2009) *Traffic* **10** 1377-1389
34. Zerial M., McBride H. (2001) *Molecular Cell Biology* **2** 107-119
35. Goishi K., Mizuno K., Nakanishi H., Sasaki T. (2004) *Biochemical and Biophysical Research* **324** 294-301
36. Wood S., Meeths M., Chiang S., Bechensteen A., Boelens Bryceson Y. (2009) *Blood* **114** 4117-4127
37. Hong W. (2005) *Science* **15** 644-650
38. Fukuda M. (2008) *Cellular and Molecular Life Sciences* **65** 2801-2813
39. Izumi T., Gomi H., Kasai K., Mizutani S., Torii S. (2003) *Cell Biology* **28** 465-474
40. Fukuda M. (2003) *Journal Biological Chemistry* **278** 15390-15396
41. Fukuda M., Kanno E., Saegusa C., Ogata Y., Kuroda T. (2002) *Journal of Biological Chemistry* **277** 39673-39678
42. Koch H., Hofmann K., Brose N. (2000) *Biochemical Journal* **349** 247-253
43. Pivot-Pajot C., Varoqueaux F., Saint Basile G., Bourgoin S. (2008) *The Journal of Immunology* **180** 6786-6797
44. Menager M., Menasche G., Romao M., Knapnougel P., Hsuan Ho C., Saint Basile G. (2007) *Nature Immunology* **8** 257-267
45. Veillette A. (2004) *J Exp Med* **199** 1175-1178
46. Veillette A. (2006) *Nat Rev Immunol* **6** 56-66
47. Poy F., Yaffe MB., Sayos J., Saxena K., Morra M., Sumegi J., Cantley LC., Terhorst C., Eck MJ. (1999) *Mol Cell* **4** 555-561
48. Detre C., Keszei M., Romero X., Tsokos GC., Terhorst C. (2010) *Semin Immunopathol* **32** 157-171
49. Chan AY., Westcott JM., Mooney JM., Wakeland EK., Schatzle JD. (2006) *Opin Immunol* **18** 656-664
50. Ma CS., Nichols KE., Tangye SG. (2007) *Annu Rev Immunol* **25** 337-379
51. Howie D., Simarro M., Sayos J., Guirado M., Rancho J., Terhosrt C. (2002) *Blood* **99** 957-965
52. Latour S., Veillette A. (2003) *Immun Rev* **192** 212-224
53. Schwartzberg PL., Mueller KL., Qi H., Cannons JL. (2009) *Nat Rev Immunol* **9** 39-46
54. Latour S., Gish G., Helgason CD., Humphries RK., Pawson T., Veillette A. (2001) *Nature Immunol* **2** 681-690
55. Cannons JL., Yu LJ., Hill B., Mijares LA., Dombroski D., Nichols KE., Antonellis A., Koretzky GA., Gardener K., Schwartzberg PL. (2004) *Immunity* **21** 693-706
56. Morra M., Lu J., Poy F., Martin M., Sayos J., Calpe S., Gullo C., Howie D., Rietdijk S., Thompson A., Coyle AJ., Denny C., Yaffe MB., Engel P., Eck MJ., Terhorst C. (2001) *EMBO J* **20** 5840-5852
57. Sanzone S., Zeyda M., Saemann MD., Soncini M., Holter W., Fritsch G., Knapp W., Condotti F., Stulnig TM., Parolini O. (2003) *J Biol Chem* **278** 29593-29599
58. Ma CS., Hare NJ., Nichols KE., Dupré L., Andolfi G., Roncarolo M., Adelstein S., Hodgkin PD., Tangye SG. (2005) *J Clinical Inv* **115** 1049-1059
59. 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
60. 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

61. 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
62. Zhang K., Biroschak J., Glass DN., Thompson S., Finkel T., Passo MH., Binstadt BA., Filipovich A., Grom AA. (2008) *Arthritis Rheum* **58** 2892-2896
63. Peng L. (2005) *Immunol Res* **32** 201-209
64. Komori H., Furukawa H., Mori S., Ito MR., Terada M., Zhang MC., Ishii N., Sakuma N., Nose M., Ono M. (2006) *J Immunol* **176** 395-400
65. Sato T., Sato N., Takahashi S., Koshiba H., Kikuchi K. (1986) *Cancer Research* **46** 4384-9
66. 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
67. Parolini O., Weinhäusel A., Kagerbauer B., Sassmann J., Holter W., Gadner H., Haas OA., Knapp W. (2003) *Immunogenetics* **55** 116-121
68. Maric I., Pittaluga S., Dale JK., Niemela JE., Delsol G., Diment J., Rosai J., Raffeld M., Puck JM., Straus SE., Jaffe ES. *Am J Surg Pathol* (2005) **29** 903-911
69. Snow AL., Marsh RA., Krummey SM., Roehrs P., Young LR., Zhang K., van Hoff J., Dhar D., Nichols KE., Filipovich AH., Su HC., Blessing JJ., Lenardo MJ. (2009) *J Clin Invest* **119** 2976-2989

## 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 prolyl isomerase 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**

**Marcatore molecolari nel carcinoma colorettale: 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

## Seminari interni al Dipartimento di Scienze Mediche AA 2009-2010

### Regolazione del metabolismo del ferro: nuove acquisizioni

Prof.ssa C. Camaschella

10/10/2009

### Naproxcinod, 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
  - Poster 1:  
High levels of TIMP-1 play a role in development of autoimmunity/lymphoproliferation
  - Poster 2:  
High levels of SAP associated with the 346T polymorphism of its gene is a risk factor for the development of autoimmunity/lymphoproliferation

## **PUBBLICAZIONI:**

- “Serum cytokine profile during *Mycobacterium ulcerans* infection (Buruli ulcer)”  
Elisa Zavattaro, Riccardo Mesturini, Ange Dossou, **Matteo Melensi**, Roch Christian Johnson, Ghislain Sopoh, Umberto Dianzani, Giorgio Leigheb  
*International Journal of Dermatology* (2010), Vol. 49, Issue 11, 1297-1302

## Seminari interni al Dipartimento di Scienze Mediche AA 2010-2011

*Biom mineralization and preparation of biomimetic nanoapatites*

Dr. J.G. Morales

11/11/10

*Le cellule NK: dalla biologia alla terapia di leucemie ad alto rischio*

Prof. L. Moretta

29/11/10

*Linfomi cutanei primitivi*

Prof. E. Berti

02/03/11

*Ferritins: ancient proteins with novel unexpected features*

Dr.ssa S. Levi

12/04/11

*Metabolic syndrome: the gastroenterologist point of view*

Prof.ssa E. Bugianesi

13/04/11

*Liver fibrosis in children affected by NASH: how to investigate that*

Prof. V. Nobili

29/04/11

*Reverse vaccination in autoimmune diseases*

Prof. G. Filaci

03/05/11

*Innate immunity and the pathogenicity of inhaled microbial particles*

Prof. H. Wolff

09/05/11

*Farmacologia dell'aterosclerosi*

Prof. A. Corsini

13/05/11

*Ion torrent technology for massive parallel sequencing*

Dott. A. Di Nicola

23/05/11

*Iron management in the hepcidin Era*

Dr. S.R. Ellis

25/05/11

*Molecular pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease*

Prof. M. Fasano

17/06/11

**Importance of pathobiology in rheumatoid arthritis**

**Prof. Pitzalis**

**24/06/11**

**Genetics and clinical phenotypes of Frontotemporal lobar degeneration**

**Dr. J. Rohrer**

**24/06/11**

**Role of PET imaging in early drug development**

**Dr.ssa R. Sharma**

**29/06/11**

**Management of high risk chronic lymphocytic leukemia**

**Prof. T. Zenz**

**30/06/11**

**Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis**

**Prof. M. Parola**

**01/07/11**

**ATTIVITA' FORMATIVA SVOLTA:**

- Lezioni frontali (Prof. Albano, Dott.ssa Corrado, Dr. Comi) interne al dipartimento
- Journal Club interni al dipartimento

**PARTECIPAZIONE CONGRESSI:**

- 2° Giornata IRCAD  
*Celiachia-vecchie conoscenze e novità dalla ricerca*  
Novara, 21/05/2011
- II Congresso Nazionale IFIACI  
*Federazione delle società italiane di immunologia, allergologia ed immunologia clinica*  
Roma, 25-28/05/2011
  - Poster:  
Il polimorfismo -346T del gene *SH2D1A* è associato allo sviluppo di autoimmunità e linfoproliferazione in soggetti maschi con ridotta funzione del recettore Fas