

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

**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
(XVI CICLO)**

Relazione IV° anno:

**“Un approccio funzionale per lo
screening di una library alla ricerca di
nuove mutazioni genetiche responsabili
di difetti dell’apoptosi nell’uomo”**

Thea Bensi

INTRODUZIONE

Negli organismi pluricellulari il corretto rapporto fra numero e tipo cellulare è mantenuto grazie all'equilibrio fra i processi proliferativi e i meccanismi di morte [1]. La morte cellulare programmata si compie attraverso un meccanismo conservato di suicidio, denominato *apoptosi* [2, 3, 4]. L'apoptosi è un fenomeno fisiologico essenziale che gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo e nell'omeostasi tissutale. Le cellule apoptotiche sono caratterizzate da specifici cambiamenti morfologici e biochimici, che includono *cell shrinkage*, condensazione e segmentazione nucleare, frammentazione del citoplasma e del DNA. Per attivare un processo apoptotico la cellula necessita di una serie di stimoli come la deprivazione di fattori di crescita [5], le radiazioni ionizzanti [6] o l'attivazione di recettori cellulari di membrana come il recettore I del TNF [7] o Fas [8]. Numerose evidenze hanno dimostrato che alterazioni nella sopravvivenza cellulare concorrono allo sviluppo patologie tra cui neoplasie [9], infezioni virali [10], malattie autoimmuni [11], disordini neurodegenerativi [12] e la sindrome da immunodeficienza acquisita [13]. Terapie specifiche volte ad aumentare o diminuire la suscettibilità dei vari tipi cellulari alla morte cellulare programmata formano la base per il trattamento di diverse patologie umane.

Fas

CD95 (APO-1/Fas) è una glicoproteina di membrana appartenente alla superfamiglia dei recettori per il TNF/NGF, nel sottogruppo dei recettori di morte (*death receptors*) [14], che comprende oltre a Fas anche TNF-R1, DR3, TNF related apoptosis-inducing ligand (TRAIL-R1), TRAIL-R2 e DR6 [15]. Fas è caratterizzato, nella porzione extracellulare, da 3 domini ricchi in cisteine (CRDs); nella porzione intracellulare è invece presente un *death domain*, importante per la trasmissione del segnale apoptotico. Il *death domain* consente l'interazione tra proteine per il reclutamento di proteine citosoliche necessarie per la cascata di trasduzione del segnale. L'interazione di Fas, assemblato in forma trimerica, con un trimero di FasL (CD95L) [16] innesca la cascata di segnali che portano alla morte apoptotica della cellula. L'attivazione di Fas porta alla formazione del *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC) [17] costituito da una molecola adattatrice, *FADD* (Fas-Associated Death Domain) [18, 19] che media l'interazione fra Fas e la caspasi 8 (FLICE) [20-22] (**Fig.1**). L'attivazione della caspasi 8 innesca una cascata proteolitica attivatoria che coinvolge altri membri della famiglia delle cisteino-proteasi. Dopo la formazione del DISC, caspasi 8, sintetizzata come pro-enzima inattivo, subisce un processo auto-catalitico che risulta nella produzione della forma attiva, che viene rilasciata nel citosol come etero-tetramero.

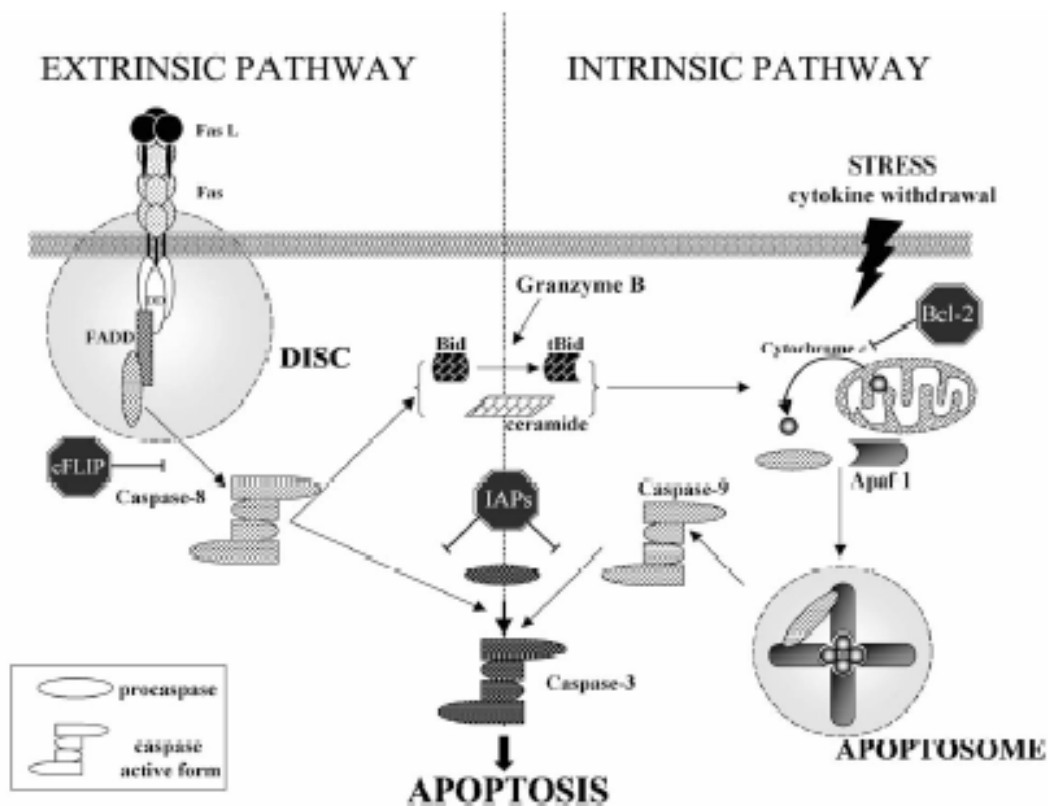


Fig. 1 La cascata di trasduzione di segnale innescata dai recettori di morte: vie intrinseca e estrinseca. La via estrinseca e' innescata dal legame del ligando al recettore di morte e porta all'attivazione di caspasi-8; la via intrinseca, invece, e' innescata da alterazioni mitocondriali che causano il rilascio di citocromo *c* e l'attivazione di caspasi-9. Entrambe le vie convergono su caspasi-3. L'attivazione di caspasi-8 puo' anche causare l'attivazione della via intrinseca scindendo la forma citosolica di Bid e rilasciando tBid o attivando una sfingomielinasi acida e producendo ceramide.

Nelle cellule di tipo I, le caspasi 8 e 10 (dette caspasi "iniziatrici") attivano le caspasi "esecutrici" 3, 7, 6, le quali intervengono in varia misura sui diversi aspetti della morte cellulare programmata [23, 24]. Tuttavia, nelle cellule di tipo II, subito dopo la formazione del DISC, le caspasi utilizzano la via mitocondriale come sistema di amplificazione del segnale. Caspasi 8 cliva *Bid*, che appartiene alla famiglia di Bcl-2; la forma clivata di Bid attiva la via mitocondriale. In entrambi i tipi cellulari (tipo I o II) la via mitondriale e' attivata, ma nelle cellule di tipo I questa via non e' strettamente necessaria (**Fig.2**). Il mitocondrio 'attivato' rilascia nel citoplasma molecole pro-apoptotiche come *SMAC/Diablo* e *citocromo c*. Queste molecole, insieme con pro-caspasi 9 e Apaf1, formano nel citoplasma un complesso chiamato *apoptosoma*, il secondo complesso iniziatore dell'apoptosi. Caspasi 9 attiva quindi altre caspasi che si trovano a valle e che propagano il segnale apoptotico (**Fig.1**) [25].

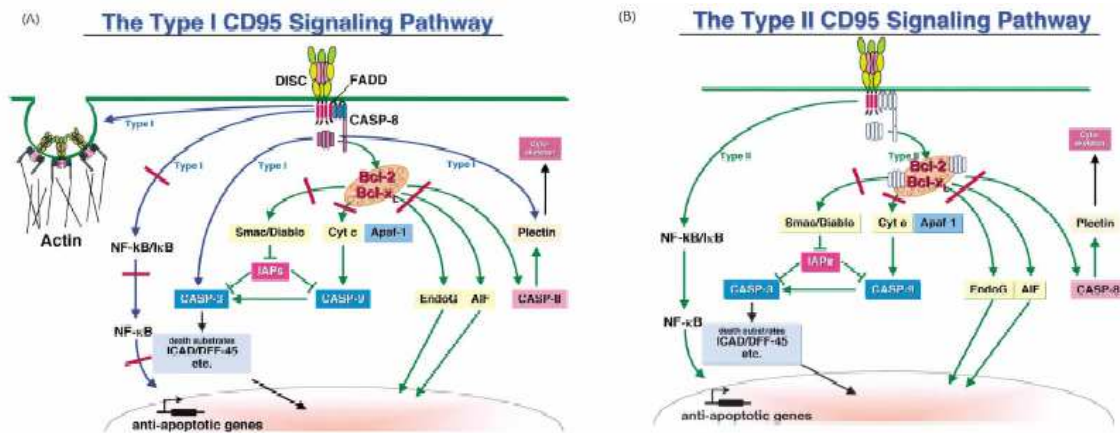


Fig.2 Illustrazione delle due vie di trasduzione del segnale innescate da CD95. (A) Nelle cellule di tipo I, grandi quantità di Caspasi 8 sono attivate dalla formazione del DISC, in grado di scindere diversi substrati. (B) Nelle cellule di tipo II, il legame di CD95L a Fas porta alla produzione di piccole quantità di Caspasi 8; queste cellule dipendono dal dall'amplificazione del segnale da parte del mitocondrio, il quale rilascia nel citosol fattori in grado di attivare Caspasi 9 ed in ultima analisi Caspasi 3.

Queste vie di trasduzione del segnale sono sotto il controllo di tre famiglie di inibitori che agiscono a diversi livelli: la famiglia di *Bcl-2*, la famiglia di *FLIP* (FLICE Inhibitor Protein) e la famiglia delle *IAP* (Inhibitor Of Apoptosis).

- 1) La famiglia del *Bcl-2* comprende diverse molecole con azione anti-apoptotica (*Bcl-2*, *Bcl-X_L*, *Bcl-w*, *Mcl-1*, *Blf-1*, *NR-13* and *Diva*) o pro-apoptotica (*Bax*, *Bcl-X_S*, *Bak*, *Bad*, *Bok*) [26-29]. Molecole come *Bcl-2* e *Bcl-X_L*, con azione anti-apoptotica, risiedono nella membrana mitocondriale esterna, mentre le molecole con azione pro-apoptotica possono essere sia presenti nel citosol sia nella membrana mitocondriale. Durante l'apoptosi, i membri pro-apoptotici della famiglia vengono attivati.
- 2) Le *IAP* comprendono una serie di proteine umane (c-IAP1, c-IAP-2, X-IAP, N-IAP, survivina) e non, le quali agiscono inattivando varie caspasi, in particolare le caspasi esecutrici. Tra queste molecole la più studiata e con l'attività pro-apoptotica più potente è X-IAP, proteina associata al cromosoma X che inibisce direttamente due caspasi esecutrici: la caspasi 3 e 9. XIAP da un lato riduce i livelli di citocromo C, dall'altro impedisce l'attivazione della caspasi 3 [30-34].
- 3) Inizialmente identificata come proteina virale (vFLIP), gli omologhi cellulari FLIP_S e FLIP_L condividono con caspasi 8 un'elevata omologia di sequenza e posseggono un dominio DED funzionale che può legarsi al DED di FADD competendo per lo stesso sito con caspasi 8. Queste molecole sono prive di attività enzimatica e sono in grado di inibire il processamento di procaspasi 8, presentando un'azione dominante negativa sulla caspasi stessa.

Fas/FasL: difetti genetici

Come accennato precedentemente, lo spegnimento della risposta immunitaria è cruciale per l'omeostasi linfocitaria e diminuisce il rischio che le cellule effettrici reclutate da antigeni *non-self* cross-reagiscano con antigeni *self*. Mutazioni a carico di questo sistema causano malattie caratterizzate dall'accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari ed autoimmunità.

Sono state individuate mutazioni recessive a carico del gene che codifica per Fas, sul cromosoma 19, e del gene che codifica per FasL sul cromosoma 1 rispettivamente nei topi *lpr* (lymphoproliferation) e *gld* (generalized lymphoproliferative disease) [35, 36]. Topi omozigoti per la mutazione (*lpr/lpr* o *gld/gld*) sviluppano linfadenopatia e splenomegalia e una malattia autoimmune generalizzata con ipergammaglobulinemia, produzione di autoanticorpi, glomerulonefrite, artrite, vasculite e accumulo negli organi linfoidi secondari di cellule T non maligne TCR $\alpha\beta^+$ CD4/CD8 doppie negative (DN). I fenomeni autoimmuni sviluppati sembrano essere dovuti in gran parte al fallimento della delezione clonale periferica dei linfociti T. Nei topi *lpr* sono stati identificati due tipi di alterazioni genetiche, una inibisce l'espressione in superficie di Fas (mutazione *lpr*), mentre l'altra porta all'espressione di una molecola di Fas incapace di trasmettere il segnale apoptotico alla cellula (mutazione *lpr^{cg}*). I topi *gld* invece sono caratterizzati da una mutazione a livello della porzione extracitoplasmatica di FasL che determina un'alterazione del sito di legame per Fas, impedendone il legame.

Il nesso causale tra l'alterata funzione del sistema Fas e la malattia è stata confermata dall'osservazione che topi knock out per Fas sviluppano un quadro simile a quello dei topi *lpr* e *gld* [37]; è inoltre possibile correggere il difetto nei topi *lpr* mediante l'espressione trasgenica della forma *wild-type* di Fas [38]. Le manifestazioni autoimmuni e l'iperproliferazione linfocitaria di questi animali è probabilmente legata al difettoso spegnimento della risposta immune da parte di Fas, che porta da un lato all'accumulo dei linfociti nel corso di attivazioni successive, e dall'altro all'espansione di cloni autoimmuni.

ALPS Features

Nell'uomo è stata descritta una condizione simile ai topi *lpr* denominata Sindrome Autoimmune/Linfoproliferativa (ALPS) [39-42]. I pazienti, in genere in età pediatrica, sviluppano una diminuita funzione della cascata di trasduzione di Fas, manifestazioni autoimmuni severe che coinvolgono principalmente le cellule del sangue (variabili associazioni di anemia, trombocitopenia, neutropenia, glomerulonefrite e vasculite). Infatti, i criteri che sono allo stato attuale utilizzati dal gruppo che si occupa di ALPS al National Institutes of Health (NIH) per identificare un paziente come ALPS includono una linfoproliferazione non neoplastica, con linfadenopatia e/o splenomegalia, linfociti che non vanno incontro ad apoptosi in seguito a trattamento con anticorpi anti-Fas ed una percentuale $\geq 1\%$ di linfociti T doppi negativi (DNT) per CD4 e CD8 (CD4 $^+$ CD8 $^-$ TCR $\alpha\beta^+$) nel sangue periferico o la presenza di cellule DNT nei tessuti linfatici. Caratteristiche a supporto della diagnosi sono la presenza di autoimmunità e/o di autoanticorpi e una storia familiare di ALPS [43].

Il difetto funzionale di Fas è dovuto a mutazioni deleterie a carico del gene di Fas (ALPS-Ia) [44] o di FasL (ALPS-Ib) [45], a mutazioni a carico della via di trasduzione del segnale di Fas (ALPS-II), come ad esempio a carico del gene che codifica per caspasi10 [46]. Queste mutazioni comportano una ridotta funzionalità della caspasi ed interferiscono con la cascata apoptotica. Recentemente, è stata descritta una mutazione a carico del gene che codifica per caspasi 8 che risulta in una ridotta apoptosi linfocitaria ed omeostasi ma, diversamente dagli altri pazienti ALPS, è presente anche un difetto di attivazione sia nelle cellule T sia B e NK, cui consegue l'immunodeficienza [47, 48]. Un ulteriore sottogruppo è rappresentato dai pazienti APLS III per i quali il difetto apoptotico è dovuto ad mutazioni sconosciute nella cascata di trasduzione del segnale.

Il nostro gruppo ha recentemente identificato pazienti che presentano un quadro clinico simile a quello ALPS, ma mancante della presenza di cellule doppie negative per CD4 e CD8. Tuttavia essi presentano una diminuita funzionalità di Fas senza presentare mutazioni a carico di Fas o FasL. Recentemente McKusick ha proposto la denominazione DALD (Dianzani's Autoimmune Lymphoproliferative Disease) per i pazienti che non presentano mutazioni in Fas o FasL e mancano della caratteristica espansione della popolazione di linfociti doppi negativi per CD4 e CD8 (OMIM ref#605233). DALD sembra essere geneticamente eterogenea: diversi geni potrebbero essere coinvolti nelle diverse famiglie e molteplici alterazioni genetiche potrebbero essere richieste per manifestare la malattia. Questo è suggerito dall'osservazione che, spesso, entrambi i genitori sani di questi pazienti sono Fas resistenti, il che suggerisce la presenza di una componente ereditaria. La possibilità che alterazioni del sistema di Fas possano essere legate a mutazioni a carico di geni diversi aumenta notevolmente lo spettro di pazienti che potrebbero essere interessati da questo tipo di mutazioni [49].

MaRX: un approccio alla genetica delle cellule

L'approccio genetico è la via più diretta che permette di delucidare processi biologici poco conosciuti. Nel 1999 Hannon GJ e colleghi [50] hanno sviluppato una nuova tecnica denominata MaRX che permette l'isolamento di nuovi geni nelle cellule di mammifero sulla base delle loro funzioni. Questo sistema si basa su due concetti per superare gli impedimenti genetici nelle cellule in coltura:

- 1- l'uso del DNA come "mutageno virtuale" piuttosto che dipendere da agenti chimici o altri mutageni. I cDNAs vengono utilizzati per alterare in modo reversibile l'espressione genica creando di conseguenza un nuovo fenotipo nelle cellule in coltura.
- 2- La tendenza di ciascun fenotipo di ritornare allo stato originario in modo spontaneo (revertare) è stata eliminata con questo sistema. Infatti, esso permette un'efficiente introduzione di library a cDNA nelle cellule target e permette anche un facile recupero di ciascun gene introdotto in una popolazione cellulare che è stata arricchita sulla base di specifiche caratteristiche biologiche.

Come illustrato in **Fig.3**, l'idea di questo sistema è la capacità di passare complesse miscele di cloni attraverso molteplici cicli di selezione fenotipica.

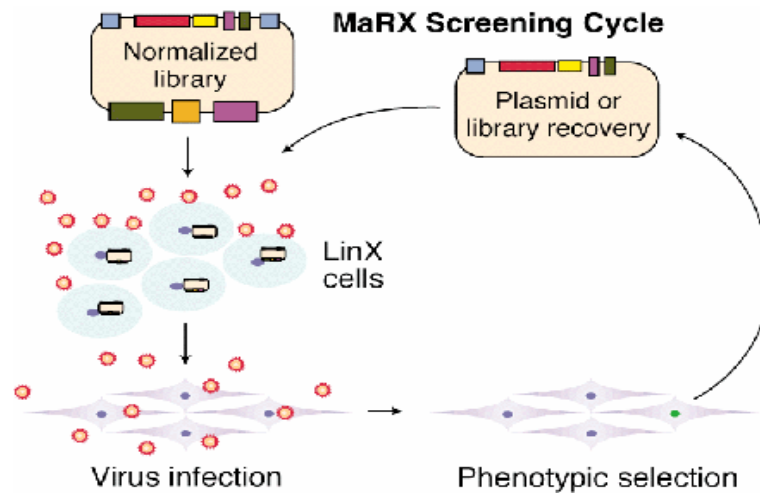


Fig.3 MaRX Cycle: una library normalizzata viene convertita in una library di retrovirus utilizzando linee cellulari packaging (LinX). Le cellule infettate vengono selezionate sulla base di specifiche caratteristiche biologiche. I provirus sono poi recuperati ed utilizzati per la produzione di virus ed ulteriori rounds di screening.

Il vettore pMaRX contiene le sequenze provirali dell'onco-retrovirus Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV), ma e' difettivo per la replicazione. La trasfezione di cDNA provirali nella linea cellulare packaging LinXA (una linea 293T derivata) permette la conversione in una library retrovirale. Le cellule LinXA producono anche stabilmente l'envelope anfortropico MMLV per facilitare l'infezione sia nelle cellule umane che in quelle di topo. Una volta che le cellule sono infettate, la presenza del gene per la resistenza all'Igromicina nel provirus permette di selezionare le cellule infettate.

A causa della difficolta' nell'utilizzo di un gran numero di linee cellulari insieme con il bisogno di esaminare complesse library e' fondamentale un'efficiente trasferimento genico. Per raggiungere questo scopo, i creatori del sistema hanno utilizzato vettori retrovirali deficienti per il processo di replicazione. Questi virus ricombinanti sono in grado di replicarsi stabilmente e cio' permette di controllare il fenotipo per molte generazioni cellulari. Tuttavia, l'analisi dei cDNAs integratisi e' complicata ed e' necessario recuperare il provirus dalle cellule ospiti.

Per questo gli autori hanno creato il vettore pMaRX II che permette un facile recupero del provirus integrato in modo stabile nel genoma delle cellule infettate (**Fig.4**). Infatti, un sito loxP riconosciuto dalla ricombinasi Cre e' stato inserito nell'LTR (Long Terminal Repeat) del vettore pMaRX II. Dopo la selezione fenotipica, il provirus fiancheggiato dai siti loxP puo' essere facilmente recuperato utilizzando la ricombinasi Cre, sia *in vivo* sia *in vitro*. L'utilizzo Cre *in vivo* permette la rimozione del cDNA integrato e di ritornare al fenotipo originario prima dell'integrazione del cDNA; l'utilizzo di Cre *in vitro* permette invece la formazione di un mini-plasmide circolare contenente il cDNA disinserito, che poi puo' essere amplificato mediante trasformazione batterica

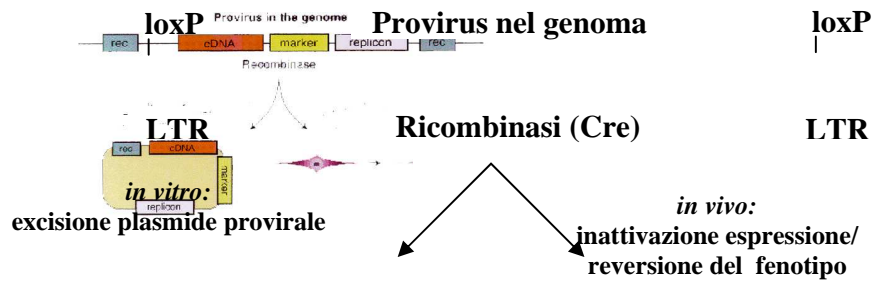


Fig.4 Excisione del vettore pMaRX mediante la ricombinasi: rappresentazione del provirus MaRX integrato e le conseguenze dell'utilizzo di Cre *in vitro* ed *in vivo*.

Il provirus pMaRX exciso ha un'unica LTR intatta, ma puo' comunque essere trasfettato nell'appropriata linea cellulare packaging.

La possibilita' di recuperare una library di provirus funzionali da una popolazione cellulare selezionata permette al gene di interesse di essere recuperato da una miscela complessa attraverso molteplici rounds di selezione.

Questo sistema in conclusione permette di clonare **mammalian genes** facendo affidamento solo sulle loro proprieta' funzionali.

SCOPO del LAVORO

In questo ultimo anno del corso di Dottorato in Medicina Molecolare ho frequentato il laboratorio del Dr. M.J. Lenardo all'NIH (Molecular Development Section, Laboratory of Immunology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases) e mi sono occupata di mettere a punto una strategia per lo screening della library ottenuta da mRNA di 10 pazienti ALPS III.

MATERIALI E METODI

• LINEE CELLULARI

Le linee cellulari packaging LinXA sono state coltivate in DMEM + 10% FBS + 75µg/ml Igromicina, mentre le SKW6.4 e le Jurkat sono state tenute in coltura in RPMI 1640 + 10% FBS. Le cellule, sia SKW6.4 sia Jurkat, dopo l'infezione sono state coltivate in RPMI 1640 + 10% FBS + 400µg/ml Igromicina per selezionare le cellule trasdotte.

• COSTRUTTI E TRASFETTANTI

I cDNA di FADD *wt* e delle forme mutate FADD F25G e F25V sono state clonati nel vettore pMaRXII utilizzando i siti di restrizione BamHI e XhoI, inseriti mediante PCR. Contemporaneamente, una sequenza *FLAG-tag* (in corsivo) è stata aggiunta alla porzione NH₂-terminale della molecola per mezzo di PCR utilizzando il primer1 (forward) 5'-CGGGATCCCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGACCCGTTTCCTGGTGCTGC-3' ed il primer2 (reverse) 5'-CCGCTCGAGTCAGGACGCTTCGGAGGTAGATG-3'. I prodotti di PCR sono stati digeriti con gli enzimi BamHI ed XhoI e ligati nel plasmide pMaRXII a sua volta digerito con BamHI ed XhoI.

La presenza di eventuali mutazioni nei costrutti è stata esclusa mediante sequenziamento.

I plasmidi contenenti FADD (24 µg) sono stati utilizzati per la trasfezione nelle linee packaging LinXA utilizzando il metodo della lipofectamina (Invitrogen) da soli (24 µg) o in combinazione con il plasmide codificante per GFP (GFP-mmLV). 24h dopo la trasfezione è stato cambiato il terreno alle cellule LinXA, mentre dopo 2giorni il terreno di coltura è stato raccolto e filtrato con filtri con una porosità di 0,4µm. 2ml di questo sono stati sottoposti a centrifugazione per concentrare il virus prodotto dalle cellule packaging per 1h a temperatura ambiente alla velocità di 15000rpm. 1.8ml del prodotto centrifugato è stato eliminato e i restanti 200µl sono stati utilizzati per l'infezione di 0.25x10⁶ cellule (SKW6.4 e Jurkat). Le cellule sono state quindi centrifugate per 1h alla velocità di 1800rpm a temperatura ambiente e poste in un incubatore a 30°C per 24h, dopodiché sono state lavate dal virus e trasferite a 37°C risospese in terreno contenente la selezione.

• KILL ASSAY

Le cellule (SKW6.4 e Jurkat) sono state risospese in modo da avere una concentrazione finale di 0.2x10⁶ cellule/ml in una piastra da 24pozzetti. Per il saggio di morte abbiamo utilizzato un anticorpo anti-Fas (clone APO-1-3) (Kamiya) alle concentrazioni finali di 250, 100, 25, 12.5, 5, 2.5 ng/ml. Dopo 30minuti di incubazione a temperatura ambiente è stata anche aggiunta la proteina A (Sigma Aldrich) in modo che le concentrazioni finali fossero 1/10 della concentrazione di Apo-1-3 (cioè, 25, 10, 2.5, 1.25, 0.5, 0.25 ng/ml). L'aggiunta della proteina A permette di ottenere una percentuale di morte cellulare di 1 o 2 volte maggiore o di utilizzare 1/10 della normale concentrazione di anticorpo.

Dopo 24h e 72h, 0.4ml della coltura cellulare sono stati acquisiti al citofluorimetro dopo l'aggiunta di 2µl di Propidio Ioduro (100µg/ml). Le cellule sono state quindi acquisite al citofluorimetro ponendo costante il tempo di acquisizione = 30sec.

Successivamente, e' stata calcolata la percentuale di "cell loss" per mezzo della seguente formula:

$$\left[\frac{1 - (\# \text{ eventi PI nel campione})}{1 - (\# \text{ eventi PI nel controllo})} \right] \times 100$$

- **WESTERN BLOT**

Ho effettuato esperimenti di Western Blot sulle cellule trasdotte per verificare l'espressione dei costrutti. Esse sono state lisate in RIPA buffer: 10mM Tris-HCl pH8.0, 140mM NaCl, 0.025% NaN₃, 5mM IAA (IodoAcetAmide), 1% NaDoc, 0.1% SDS + 1mM PMSF+ 1x Protease Inhibitor Cocktail +1µl Benzonase.

Il gel di gradiente 4-20% (Invitrogen) è stato corso a 200V costanti e trasferito 1h a 19V mediante il TransBlotter BioRAD.

Per l'identificazione di FADD, FLAG, GFP o β-actina è stato utilizzato l'mAb primario IgG1 alla concentrazione di 1 µg/ml, mentre come secondario α-mouse coniugato HRP. L'avvenuta reazione è stata rivelata per mezzo di una reazione di chemiluminescenza utilizzando il substrato ECL (Pierce).

- **IMMUNOPRECIPITAZIONE**

100x10⁶ cellule sono state lisate in RIPA buffer e 10mg di lisato totale sono stati prima sottoposti a preclearing in rotazione 1h e 30min. a 4°C con 40µl di Proteina G. La frazione INPUT e' stata poi immunoprecipitata (con altri 40µl di Proteina G) con un anticorpo α-FLAG (10µg/ml) in rotazione O.N. a 4°C. Il giorno dopo, la frazione OUTPUT e' stata conservata per il WB, mentre la resina e' stata lavata 4 volte con il lysis buffer, risospesa in 30µl di sample buffer 2x e caricata su un gel di acrilamide con gradiente 4-12%. Il gel è stato corso e trasferito seguendo la procedura standard descritta precedentemente.

- **SOUTHERN BLOT**

10µg di DNA genomico sono stati sottoposti a digestione enzimatica con l'enzima di restrizione EcoRI ed incubati a 37°C O.N.. Il prodotto della digestione e' stato precipitato con NaAc 3M ed EtOH, risospeso in H₂O e caricato su un gel di Agaroso 0.8%. Il contenuto del gel e' stato trasferito O.N. mediante un apparato di trasferimento per capillarita' Schleicher&Schuell utilizzando una soluzione

3M NaCl + 8mM NaOH. Il DNA e' stato fissato alla membrana mediante luce UV ($120\text{mJ}/\text{cm}^2$) e preibridato con una soluzione cosi' composta: 6x SSC, 5% Denhardt's, 0.5% SDS (Quality Biological Inc.) per 1h a 65°C . 100ng di prodotto di PCR codificante per gag sono stati utilizzati per preparare la sonda marcata con dCTP P^{32} utilizzando il kit Ready-to-go DNA labelling beads (-dCTP) (Amersham); la sonda e' stata purificata utilizzando Micro-spin G25 Columns (Amersham), risospesa in 10ml di soluzione di ibridazione ed incubata O.N. a 65°C . Il giorno dopo sono stati effettuati 2lavaggi in una soluzione 2x SSC, 0.5% SDS e 2lavaggi con una soluzione 0.2x SSC, 0.5% SDS. La nitrocellulosa e' stata quindi sottoposta ad autoradiografia.

RISULTATI

✓ *SCELTA DELLE LINEE CELLULARI*

Uno dei maggiori ostacoli nell'approccio allo screening della nostra library e' stato mettere a punto le condizioni per la trasduzione retrovirale. Per quanto riguarda l'infezione, il nostro obiettivo era una percentuale di infezione del 30%, che corrisponde ad una sequenza provirale integrata per cellula infettata. Abbiamo quindi ottimizzato le condizioni per ottenere virus in grado di trasdurre il costrutto GFP-MMLV nelle cellule murine NIH 3T3 con il 100% di efficienza (data non mostrati). Tuttavia, dato che nei pazienti ALPS sono i linfociti a presentare il difetto apoptotico, abbiamo dovuto concentrare i nostri sforzi su delle linee cellulari linfocitarie di derivazione umana. La linea cellulare packaging LinXA, utilizzata per la produzione virale, produce stabilmente anche l'envelope anfotropico MMLV, il quale facilita l'infezione sia nelle cellule umane sia in quelle murine. Tuttavia, nel nostro caso, questo non era sufficiente per ottenere i livelli di infezione desiderati. Abbiamo quindi scelto di co-trasfettare anche un plasmide di uno pseudotipo che presentava sequenze dell'envelope del virus endogeno del gatto, RD114. Siamo stati quindi in grado a questo punto di raggiungere percentuali di infezione del 30%.

Per il nostro screening abbiamo scelto due linee cellulari umane: le SKW6.4, una linea linfoblastoide EBV derivata e le Jurkat, una linea cellulare leucemica. Le SKW6.4 sono cellule di tipo I, che producono grandi quantita' di caspasi 8 attiva che viene poi recrutata nel DISC; le Jurkat invece sono cellule di tipo II, che producono una caspasi 8 poco attiva nel DISC e quindi dipendono dall'amplificazione dovuta al mitocondrio. Entrambe le linee cellulari sono altamente sensibili alla morte cellulare Fas-indotta e quindi sono un eccellente modello nel quale osservare un'inibizione dell'apoptosi.

✓ *SCELTA DELLE CONDIZIONI PER LA SELEZIONE FUNZIONALE*

Un altro problema che abbiamo dovuto affrontare nel corso della messa a punto del sistema di screening e' stata la scelta delle giuste condizioni per il test funzionale. In **Fig.5** e' rappresentata la differenza nella percentuale di **cell loss** nelle due linee cellulari dopo 72h di trattamento con un anticorpo anti-Fas in grado di cross-linkare il trimero. Alle dosi di 25-250 ng/ml di Apo-1 dopo 72h di trattamento non siamo stati in grado di rilevare cellule non trasdotte vive ed in grado di replicarsi ulteriormente. Abbiamo quindi incominciato la nostra selezione della library ad alte dosi di anti-Fas in modo da minimizzare un background di falsi positivi in grado di sopravvivere. A queste dosi, pero', non siamo stato in grado di far crescere cellule, anche se trasdotte con la library. Il nostro timore era quello che dosi cosi' elevate di anticorpo potessero generare un segnale apoptotico talmente potente da non poter + riconoscere un effetto anti-apoptotico dovuto ad un ipotetico gene mutante trasdotto. Abbiamo quindi deciso di ridurre arbitrariamente ed empiricamente la dose di anticorpo utilizzata a 12.5ng/ml. Questa dose in genere permette di uccidere dal 80 al 100% delle cellule (dati non mostrati). Inoltre, per minimizzare il background dei falsi positivi abbiamo deciso di sottoporre le cellule trasdotte a 2-3 rounds di selezione con anticorpo anti-Fas. A queste dosi di

anticorpo nelle cellule non trasdotte non abbiamo notato, dopo 3 round di selezione, la crescita di cellule diventate spontaneamente resistenti (dati non mostrati).

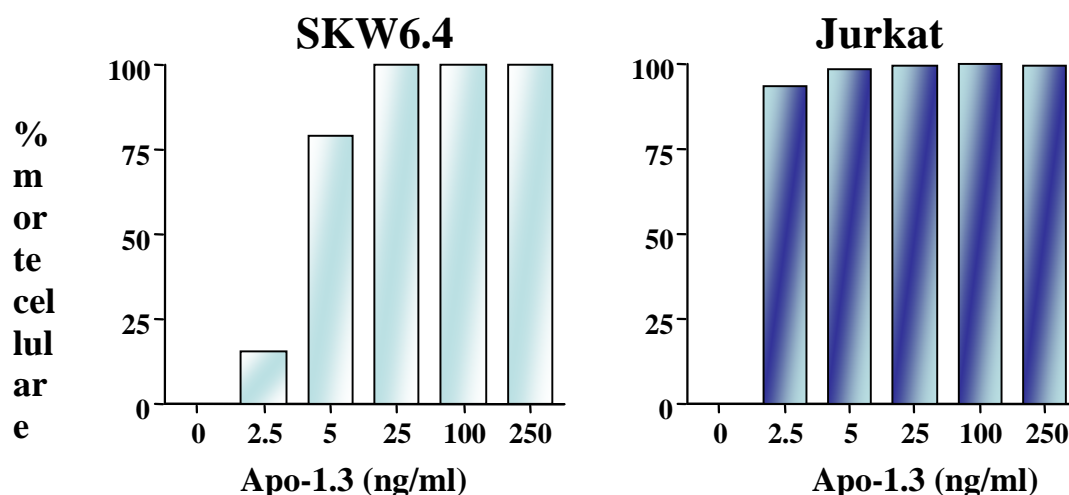
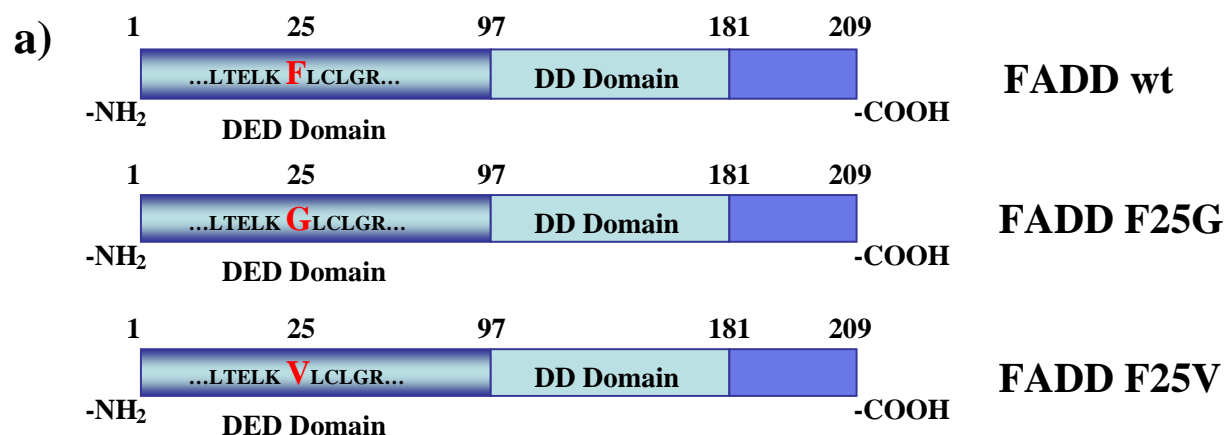


Fig.5 Percentuale di cell loss dopo 72h di trattamento con Apo-1, anticorpo in grado di cross-linkare il trimero. Alle dosi di 25-250 ng/ml di Apo-1 non ci sono cellule vive, sia tra le SKW6.4 sia tra le Jurkat.

✓ *SCelta DEL CONTROLLO POSITIVO PER LA SELEZIONE FUNZIONALE*

Per mettere a punto le condizioni da utilizzare nella selezione funzionale e per convalidare il sistema, abbiamo subclonato nel vettore pMARXII i cDNA che codificano per FADD wt e per due suoi mutanti dominanti negativi: FADD F25G e FADD F25V. Tutti questi cDNA sono stati fusi con la sequenza per FLAG all'estremità N-terminale. In questi costrutti mutazioni puntiformi portano a sostituzioni amminoacidiche nel DED domain (**Fig.6a**). Queste sostituzioni sono in grado di prevenire il reclutamento delle caspasi iniziatrici nel DISC e compromettono l'apoptosi. La trasduzione di queste sequenze mutate nelle cellule SKW6.4 e' stata molto efficiente (**Fig.6b**) ed inibisce parzialmente la morte cellulare indotta da anticorpi anti-Fas. Questi effetti sono maggiormente evidenti ad alte concentrazioni di anticorpo, ma sono comunque evidenti a 12.5 ng/ml, la concentrazione che abbiamo scelto per la nostra selezione funzionale (**Fig.6c**).



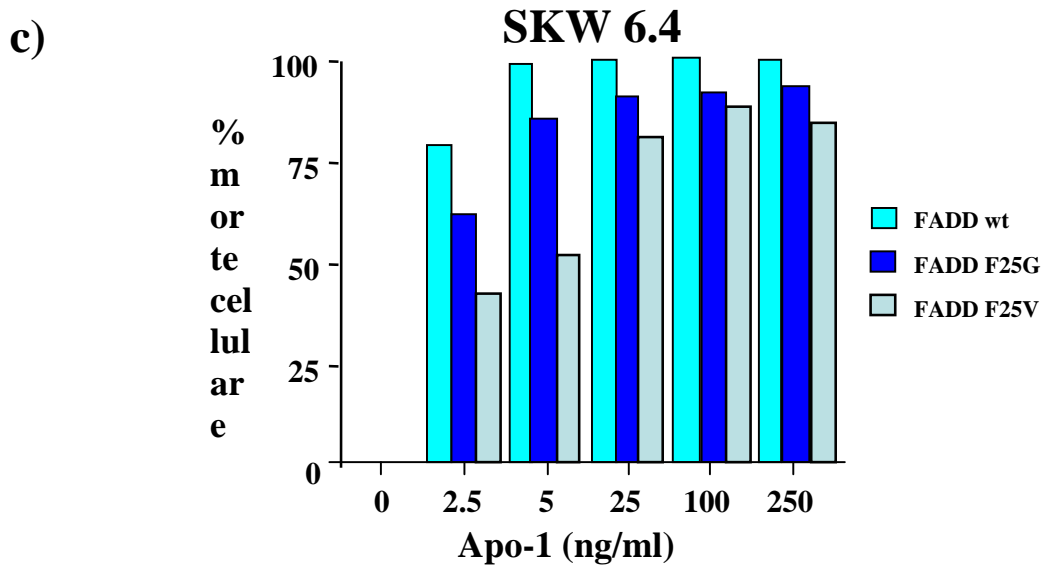
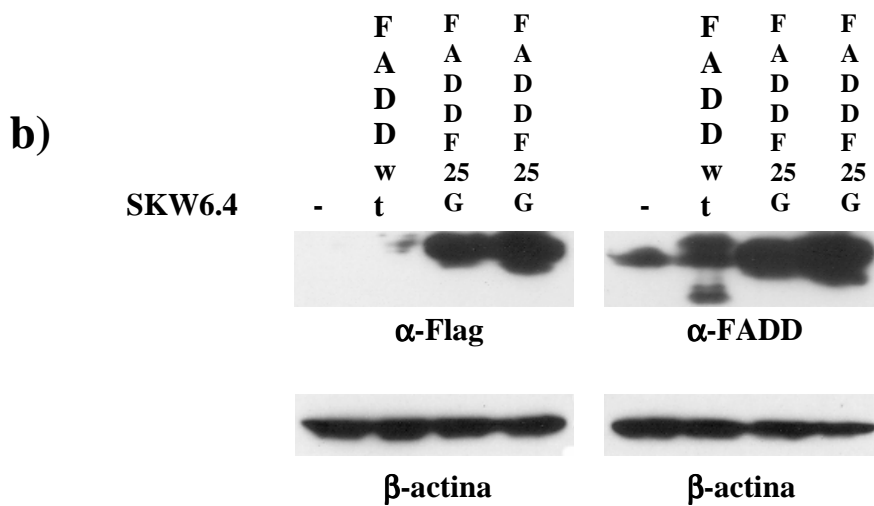
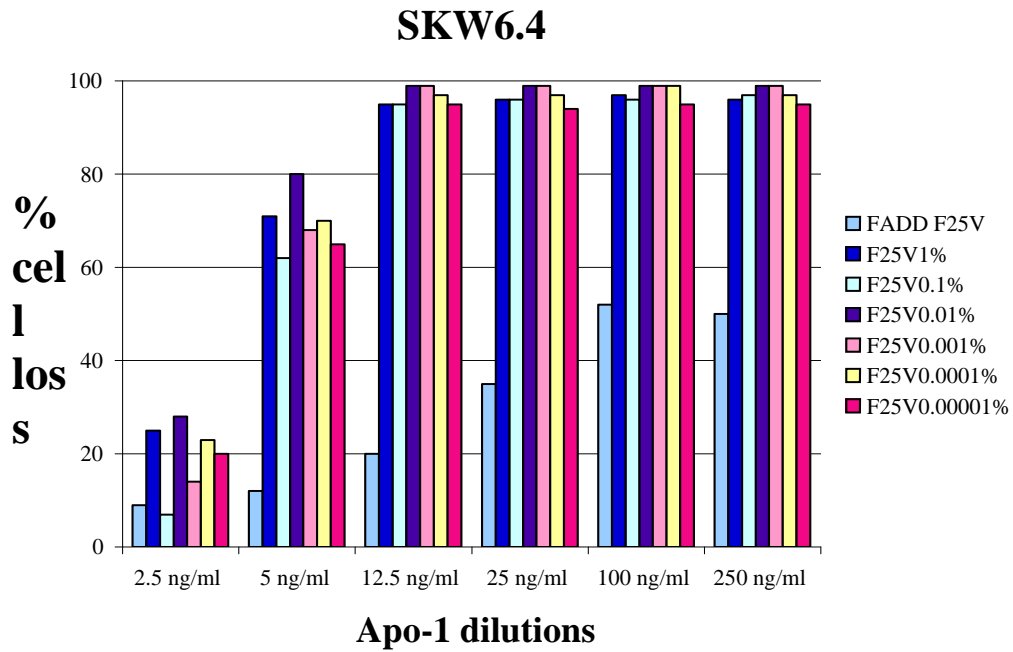


Fig. 6 a) Rappresentazione schematica del cDNA di FADD e dei mutanti dominanti negativi con in evidenza le mutazioni puntiformi; b) western blot che rivela l'ottima espressione dei cDNA trasdotti nelle cellule SKW6.4; c) l'inibizione della morte cellulare indotta da Apo-1 e' maggiore a concentrazioni intermedie, ma e' comunque evidente alle alte concentrazioni usate nel nostro test.

A questo punto ci siamo chiesti quale fosse la risoluzione minima del nostro sistema di screening e, per fare questo, abbiamo messo a punto diluizioni scalari del mutante FADD F25V-Flag (da 1% a 0.00001%) in presenza del 99% del costrutto GFP-MMLV ed abbiamo trasdotto le cellule SKW6.4 e Jurkat. La trasduzione del costrutto codificante per GFP ci ha permesso di monitorare il grado di trasduzione delle cellule. Abbiamo, quindi, saggiato la resistenza alla morte indotta da Apo-1 delle linee cellulari trasdotte con le diverse diluizioni scalari. Dopo il primo saggio funzionale, tutte le diluizioni sono risultate sensibili allo stimolo apoptotico alla concentrazione di 12.5ng/ml (**Fig.7**).

a)



b)

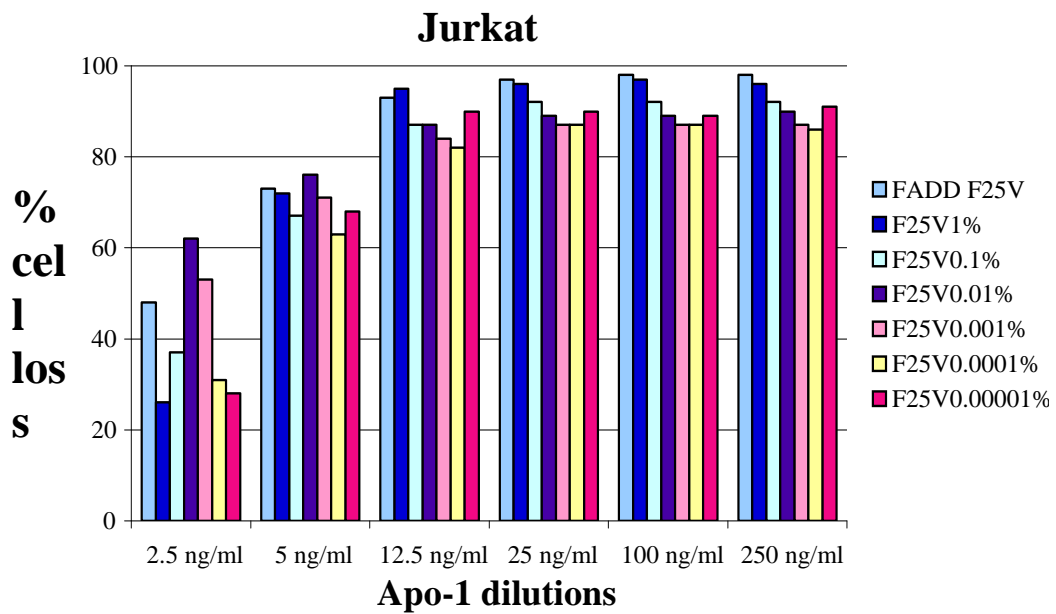


Fig.7 Percentuale di morte cellulare alle diverse concentrazioni di Apo-1 dopo il primo round di selezione funzionale. Sia le SKW6.4 (a) sia le Jurkat (b) sono risultate sensibili allo stimolo apoptotico alla concentrazione da noi scelta per la selezione funzionale (12.5ng/ml).

Dopo 72h di stimolo apoptotico, meta' delle cellule e' stata utilizzata per l'acquisizione al citofluorimetro ed il calcolo della morte cellulare, mentre l'altra meta' e' stata lavata dal terreno

contente Apo-1 e rimessa in coltura con terreno contenente Igromicin. Le cellule sono state quindi tenute in coltura ed espanse per procedere al secondo ed al terzo round di selezione funzionale. Dopo il secondo round solo le cellule trasdotte con l'1% del mutante F25V erano resistenti allo stimolo apoptotico (**Tab.1**). Al terzo round di selezione funzionale sono risultate resistenti le cellule trasdotte con lo 0.1% del mutante dominante negativo F25V, ma, sorprendentemente, anche le cellule trasdotte con lo 0.0001% e lo 0.00001%; invece le cellule trasdotte con lo 0.01% o lo 0.001% del mutante FADD non sono sopravvissute al secondo round di selezione funzionale (**tab**).

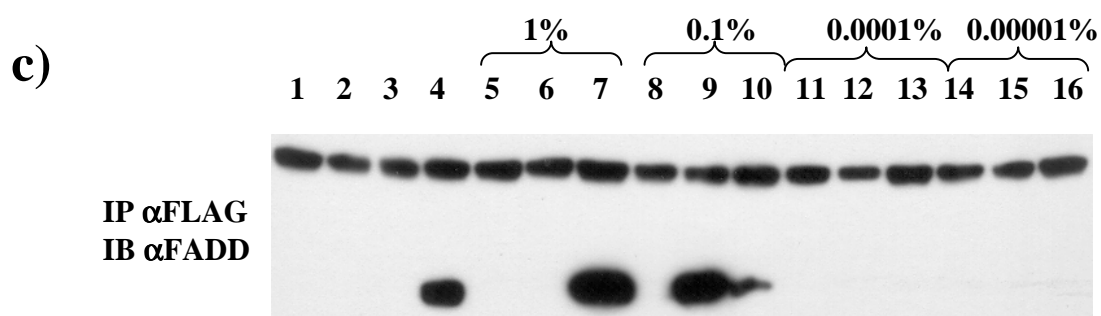
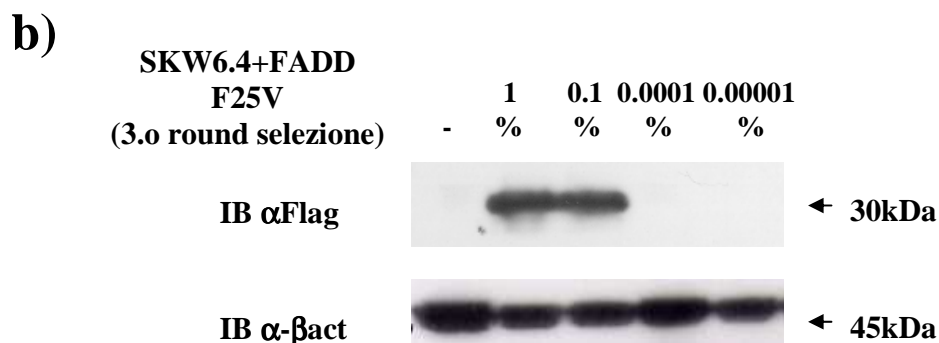
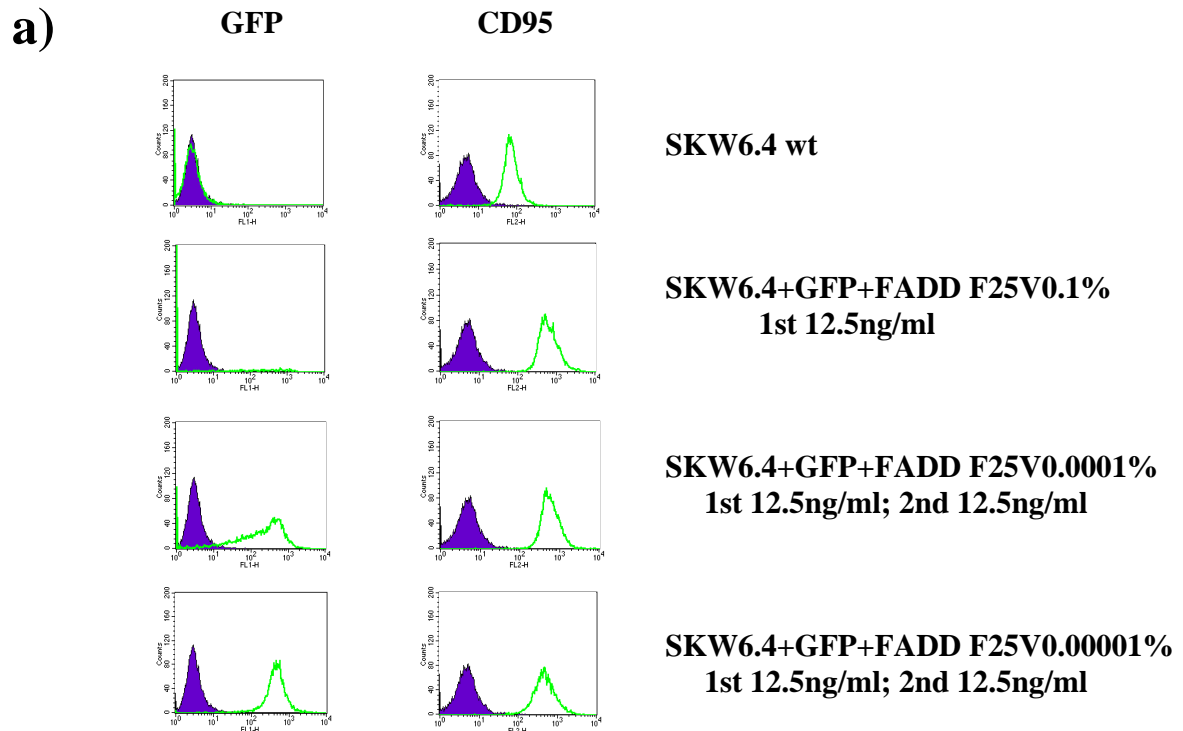
FADD F25V	1st kill 12.5ng/ml Apo-1	2nd kill 12.5ng/ml Apo-1	3rd kill 12.5ng/ml Apo-1
1%	sensitive	resistant	
0.1%	sensitive	sensitive	resistant
0.01%	sensitive	not grown	
0.001%	sensitive	not grown	
0.0001%	sensitive	sensitive	resistant ???
0.00001%	sensitive	sensitive	resistant ???

Tab.1 Rappresentazione schematica dei risultati dei 3 round di selezione funzionale con Apo-1.

Questo risultato ci ha molto incuriosito e preoccupato allo stesso tempo. Ci siamo perciò chiesti quali potessero essere le spiegazioni a tale fenomeno. Diverse sono le possibili spiegazioni che abbiamo trovato:

- 1) durante la selezione con Igromicina e anti-Fas abbiamo monitorato le cellule ed abbiamo notato che le cellule GFP⁺ sono man mano morte e solo le cellule FADD⁺ sono sopravvissute: con il nostro metodo di selezione funzionale siamo riusciti a arricchire la popolazione cellulare desiderata. Questo era vero per cellule trasdotte con l'1% o lo 0.1% del mutante FADD F25V, ma non per le cellule trasdotte con lo 0.0001% o lo 0.00001%. Ci siamo quindi chiesti se la resistenza acquisita da questi due ultimi tipi cellulari fosse dovuta ad una qualche mutazione che non permettesse l'espressione di Fas in superficie. Come è mostrato in **Fig. 8a**, tutte le linee cellulari analizzate hanno un'ottima espressione di Fas in superficie e quindi la resistenza alla morte cellulare di queste linee non poteva essere attribuita alla nostra prima ipotesi.
- 2) Un'altra eventualità poteva essere una co-espressione del mutante FADD F25V e di GFP, ma anche in questo modo non risponderemmo alla domanda: perché queste cellule sono resistenti alla morte cellulare indotta da Fas? Ci siamo chiesti perciò se queste cellule esprimessero il mutante trasdotto ed abbiamo quindi allestito un WB decorando la nitrocellulosa con un anticorpo α -Flag, in grado di riconoscere la forma di fusione FADD F25V-Flag. Da come si può osservare in **Fig. 8b** non c'è espressione della forma Flag-FADD F25V nelle cellule trasdotte con miscele che presentano meno dell'0.1% di FADD F25V, anche dopo tre cicli di selezione. Abbiamo fatto quindi un ultimo tentativo provando ad immunoprecipitare la forma 'flaggata' di FADD F25V da 10mg di lisato totale e poi decorando la nitrocellulosa con l'anticorpo anti-FADD. Come è evidente in **Fig. 8c**, neanche in questo caso siamo stati in

grado di visualizzare la forma mutata trasdotta nelle cellule SKW6.4 alle percentuali 0.0001% e 0.00001%. Abbiamo anche eseguito un Western Blot decorando la nitrocellulosa con un anticorpo anti-GFP ed il risultato e' assolutamente complementare a quello dell'immunoprecipitazione: dove c'e' FADD non c'e' GFP e viceversa. L'unico risultato positivo e' che, per quanto riguarda le miscele 1% e 0.1%, siamo stati in grado dopo 2 rounds di selezione di selezionare le cellule resistenti all'apoptosi.



IgG

30kDa

27kDa

Fig.8 a) Espressione superficiale di CD95 nelle cellule trasdotte; b) Western Blot che mette in evidenza nelle cellule SKW6.4 la mancanza di espressione del mutante FADD F25V-Flag alle percentuali di 0.0001% e 0.00001% dopo 3 cicli di selezione con un anticorpo anti-Fas; c) IP α Flag, IB α FADD sui lisati totali delle SKW6.4 trasdotte con le varie miscele (vedi legenda), IB α GFP sulle frazioni INPUT dell'immunoprecipitazione

LEGENDA:

- 1) SKW6.4 wt
- 2) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114
- 3) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114 + pM ϕ
- 4) SKW6.4 + F25V 100%
- 5) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114 + pM-F25V 1% } 1%
- 6) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114 + pM-F25V 1% 1round@12.5ng/ml }
- 7) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114 + pM-F25V 1% 2round@12.5ng/ml }
- 8) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114 + pM-F25V 0.1% } 0.1%
- 9) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114 + pM-F25V 0.1% 1round@12.5ng/ml }
- 10) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114 + pM-F25V 0.1% 2round@12.5ng/ml }
- 11) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114 + pM-F25V 0.0001% } 0.0001%
- 12) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114 + pM-F25V 0.0001% 1round@12.5ng/ml }
- 13) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114 + pM-F25V 0.0001% 2round@12.5ng/ml }
- 14) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114 + pM-F25V 0.00001% } 0.00001%
- 15) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114 + pM-F25V 0.00001% 1round@12.5ng/ml }
- 16) SKW6.4 + GFP-mmLV + RD114 + pM-F25V 0.00001% 2round@12.5ng/ml }

- 3) La nostra ultima ipotesi era che dalla selezione con Igromicina e anti-Fas avessimo ottenuto solo popolazioni clonali originatesi da un'unica cellula resistente alla morte cellulare Fas indotta non a causa della trasduzione del mutante dominante negativo FADD F25V-Flag, ma per mutazioni spontanee. Siamo quindi andati ad effettuare un Southern Blot sui DNA genomici estratti dalle linee cellulari precedentemente analizzate (vedi legenda). La nitrocellulosa e' stata ibridata con una sonda (gag) in grado di riconoscere il plasmide pMaRX II integratosi nel genoma (la sequenza per gag e' inserita nel plasmide) e sembra che le linee cellulari trasdotte siano clonali. Tuttavia anche da questo esperimento si puo' osservare che siamo stati in grado di arricchire la popolazione cellulare che esprime il mutante FADDF25V (vd lanes 5,6,7 e 8,9,10).

**Sonda:
gag-
dCTP***

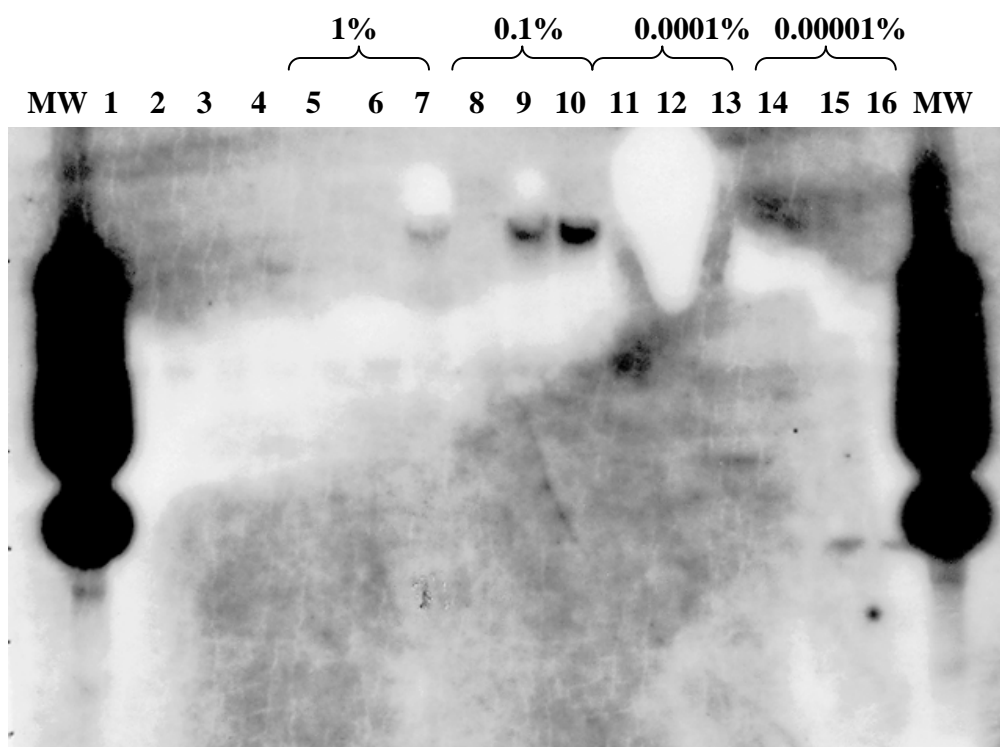


Fig.9 Southern Blot sui DNA genomici estratti dalle linee cellulari precedentemente analizzate (vedi legenda). La nitrocellulosa e' stata ibridata con una sonda (gag) in grado di riconoscere il plasmide pMaRX II integratosi nel genoma. Le linee cellulari selezionate sfortunatamente sembrano essere clonali. Tuttavia, con il nostro metodo di selezione, siamo stati in grado di arricchire la popolazione cellulare esprimente F25V FADD-Flag (vedi lanes 5,6,7 e 8,9,10).

DISCUSSIONE

Il complesso Fas/FasL è il sistema molecolare meglio caratterizzato per lo spegnimento della risposta immunitaria [35, 36] dove svolge due ruoli fondamentali. Da un lato, rappresenta uno dei meccanismi attraverso cui i linfociti con capacità citotossiche uccidono il bersaglio: essi esprimono infatti FasL la cui interazione con Fas espresso sulla superficie delle cellule bersaglio innesca la morte cellulare programmata di quest'ultime. Dall'altro, Fas è coinvolto nel processo di spegnimento della risposta immunitaria in quanto i linfociti attivati esprimono elevati livelli di Fas e sono quindi sottoposti al controllo negativo da parte di linfociti o altri tipi cellulari che esprimono FasL [51].

Sono state individuate mutazioni recessive a carico del gene che codifica per Fas, sul cromosoma 19, e del gene che codifica per FasL sul cromosoma 1 rispettivamente nei topi *lpr* (lymphoproliferation) e *gld* (generalized lymphoproliferative disease) [36, 37].

Nell'uomo è stata descritta una condizione simile a quella dei topi *lpr* denominata Sindrome Autoimmune Linfoproliferativa (ALPS) [39-42]. I pazienti presentano una diminuita funzione di Fas, severe manifestazioni autoimmuni che coinvolgono principalmente le cellule del sangue (trombocitopenia, anemia, neutropenia), estesa, ma non neoplastica, linfadenopatia e/o splenomegalia dovuta ad un accumulo policlonale di cellule B e T ed espansione di cellule T doppie negative per CD4 e CD8 nel sangue periferico [49]. Sono state identificate mutazioni responsabili dello sviluppo della malattia a carico di Fas (ALPS Ia), di Fas-L (ALPS Ib) e mutazioni a carico di molecole coinvolte nella trasduzione del segnale (ALPS II). Un ulteriore sottogruppo è rappresentato dai pazienti ALPS III per i quali il difetto apoptotico è dovuto a mutazioni ancora sconosciute nella cascata di trasduzione del segnale [49].

Proprio per delucidare le basi genetiche responsabili di questa malattia, il laboratorio del Dr. M.J. Lenardo all'NIH (Molecular Development Section, Laboratory of Immunology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases) ha creato una library di cDNA, prodotta a partire da mRNA appartenenti a 10 pazienti APLS III. Il nostro obiettivo è stata quello di portare avanti uno screening funzionale di questa library.

Per validare il nostro approccio, abbiamo effettuato esperimenti utilizzando mutanti dominanti negativi di FADD in grado di interferire con l'apoptosi indotta dalla trimerizzazione di Fas. Siamo stati quindi in grado di isolare cellule trasdotte con il mutante a bassa frequenza da popolazioni miste di cellule trasdotte con sequenze non in grado di interferire con il processo apoptotico. I nostri risultati ci hanno permesso di ottimizzare le condizioni della selezione funzionale per poi riuscire ad aumentare il recupero delle cellule che hanno integrato geni che sono in grado di interferire in modo dominante con l'apoptosi. Questo approccio appare promettente ed in grado di aiutarci a scoprire le cause molecolari dell'ALPS e potrebbe potenzialmente consentire la comprensione della biologia dell'attivazione linfocitaria e della morte cellulare, dell'autoimmunità e della linfomagenesi nell'uomo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. 1992, 356: 397-400. Review.
- [2] Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980; 68: 251-306. Review.
- [3] Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol*. 53: 55-63. Review
- [4] Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*. 1994 76: 777-9. Review.
- [5] Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*. 1994 124: 1-6. Review.
- [6] Muschel RJ, Soto DE, McKenna WG, Bernhard EJ. Radiosensitization and apoptosis. *Oncogene*. 1998 17: 3359-63. Review.
- [7] Smyth MJ, Johnstone RW. Role of TNF in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Microsc Res Tech*. 2000, 50: 196-208. Review.
- [8] Owen-Schaub L, Chan H, Cusack JC, Roth J, Hill LL. Fas and Fas ligand interactions in malignant disease. *Int J Oncol*. 2000 17: 5-12. Review.
- [9] Engelmann I, Bauer G. How can tumor cells escape intercellular induction of apoptosis? *Anticancer Res*. 2000, 20:2297-306. Review.
- [10] Soares MV, Maini MK, Beverley PC, Salmon M, Akbar AN. Regulation of apoptosis and replicative senescence in CD8+ T cells from patients with viral infections. *Biochem Soc Trans*. 2000 28: 255-8. Review.
- [11] Ravirajan CT, Pittoni V, Isenberg DA. Apoptosis in human autoimmune diseases. *Int Rev Immunol*. 1999; 18:563-89. Review.
- [12] Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*. 1989 Jul 21; 245: 301-5.
- [13] Inazawa J, Itoh N, Abe T, Nagata S. Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. *Genomics*. 1992, 14: 821-2.
- [14] Peter M.E., Scaffidi C., Medema J.P., Kischkel F.C. and Krammer P.H. The death receptors in apoptosis: biology and mechanisms. *Results and Problems in Cells Differentiation*. Vol. 23 S. Kumar. Ed. Springer-Verlag, Heidelberg. p. 25, 1999

- [15] Pan G, Bauer J.H., Haridas V., Wang D., Liu D., Yu G., Vincenz C., Aggarwal B.B., Ni J., and Dixit S. Identification and functional characterisation of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett.* 431:351, 1998
- [16] Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FK, Johnson M, Lynch D, Tsien RY, Lenardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science.* 2000 Jun 30; 288: 2354-7.
- [17] Kischkel F.C., Hellbardt S., Behrmann I., Germer M., Pawlita M., Krammer P.H., and Peter M.E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95) associated proteins from a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14:5579, 1995
- [18] Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 1995 May 19; 81: 505-12.
- [19] Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem.* 1995, 270: 7795-8.
- [20] Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell.* 1996, 85: 817-27.
- [21] Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 1996, 85: 803-15.
- [22] Fernandes-Alnemri T, Armstrong RC, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Litwack G, Alnemri ES. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 199, 93: 7464-9.
- [23] Cohen G.M.: Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-16, 1997.
- [24] Kothakota S., Azuma T., Reinhard C. et al.: Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298, 1997.
- [25] Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000, 407: 789-95. Review.
- [26] Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999, 13: 1899-911.
- [27] Gross A., McDonnell, J.M., and Korsmeyer S.R. (1999) Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes and Dev.* 13, 1899-1911.

- [28] Pan G., O'Rourke K., Dixit V.M.: Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 273, 5841-5845, 1998.
- [29] Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther.* 2001, 92: 57-70. Review.
- [30] Deveraux Q.L., Roy N., Stennicke H.R. et al.: IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 17, 2215-2223, 1998.
- [31] Seshagiri S., Miller L.K.: Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13606-13611, 1997.
- [32] Roy N., Deveraux Q.L., Takahashi R. et al. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 16, 6914-6925, 1997.
- [33] Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S. et al. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388, 300-304, 1997.
- [34] Ambrosini G., Adida C., Altieri D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917-921, 1997.
- [35] Nagata S., Golstein P.: The Fas death factor. *Science* 449-1456, 1995
- [36] Nagata S.: Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365, 1997.
- [37] Adachi M., Suematsu S., Kondo T. et al.: Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in the peripheral lymphoid organs and liver. *Nature Genet.* 11, 294-300, 1995
- [38] Wu J., Zhou T., Zhang J. et al.: Correction of accelerated autoimmune disease by bearly replacement of the mutated *lpr* gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MLR-*lpr/lpr* mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91, 2344-2348, 1994.
- [39] Fisher G.H., Rosenberg F.J., Straus S.E. et al.: Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935-946, 1995.
- [40] Rieux-Laucat F., Le Deist F., Hivroz C. et al.: Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268: 1347-1349, 1995.
- [41] Drappa J., Vaishnaw A.K., Sullivan K.E. et al.: Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *N Engl J Med* 335, 1643-1649, 1996.
- [42] Bettinardi A., Brugnoli D., Quiros-Roldan E. et al.: LD. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis. *Blood* 89, 902-909, 1997.

- [43] Bleesing JJ. Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Curr Pharm Des.* 2003; 9: 265-78. Review.
- [44] Jackson CE, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr Opin Pediatr.* 1999, 11: 521-7. Review.
- [45] Choi Y, Ramnath VR, Eaton AS, Chen A, Simon-Stoos KL, Kleiner DE, Erikson J, Puck JM. Expression in transgenic mice of dominant interfering Fas mutations: a model for human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol.* 1999 93: 34-45.
- [46] Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE, Lenardo MJ. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell.* 1999 98: 47-58.
- [47] Poppema S, Maggio E, van den Berg A. Development of lymphoma in Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS) and its relationship to Fas gene mutations. *Leuk Lymphoma.* 2004, 45: 423-31. Review.
- [48] Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG, Skoda-Smith S, Atkinson TP, Straus SE, Lenardo MJ. Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature.* 2002, 419: 395-9.
- [49] Dianzani U, Chiochetti A, Ramenghi U. Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sci.* 2003, 72: 2803-24. Review.
- [50] Hannon GJ, Sun P, Carnero A, Xie LY, Maestro R, Conklin DS, Beach D. MaRX: an approach to genetics in mammalian cells. *Science*, 283: 1129-30, 1999.
- [51] Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M. et al.: Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189-1192, 1995.

PUBBLICAZIONI

1. M. B. Lucia, F. Bottarel, D. Buonfiglio, T. Bensi, S. Rutella, C. Rumi, L. Ortona, C.A. Janeway jr, R. Cauda, and U. Dianzani. Expression of the novel T cell activation molecule hpH4 in HIV-infected patients: correlation with the disease status. *AIDS Res Hum Retrov* 16:549-57, 2000.
2. Buonfiglio D, Bragardo M, Redoglia V, Vaschetto R, Bottarel F, Bonissoni S, Bensi T, Mezzatesta C, Janeway, CA jr, and U. Dianzani. The T cell activation molecule H4 and the CD28-like molecule ICOS are identical. *Eur.J. Immunol.* 30:3463-3467, 2000.
3. F. Bottarel, S. Bonissoni, M.B. Lucia, M. Bragardo, T. Bensi, D. Buonfiglio, C. Mezzatesta, D. DiFranco, C. Balotta, M.R. Capobianchi, I Dianzani, R Cauda, and U. Dianzani. Decreased function of Fas in patients displaying delayed progression of HIV-induced immune deficiency. *The Hematology Journal* 2:220-227, 2001.
4. Savarino A, Bensi T, Chiocchetti A, Bottarel F, Mesturini R, Ferrero E, Calosso L, Deaglio S, Ortolan E, Buttò S, Cafaro A, Katada T, Ensoli B, Malavasi F, Dianzani U. Human CD38 interferes with HIV-1 fusion through a sequence homologous to the V3 loop of the viral envelope glycoprotein gp120. *FASEB J* 17:461-463 , 2003.
5. Dianzani U, Bensi T, Savarino A, Chiocchetti A. Role of Fas in HIV infection. *Current HIV Res.* 1:405-417, 2003
6. Chiocchetti A, Indelicato M, Bensi T, Mesturini R, Giordano M, Sametti S, Castelli L, Bottarel F, Mazzarino MC, Garbarini L, Giacomelli F, Valesini G, Santoro C, Dianzani I, Ramenghi U, Dianzani U. High levels of osteopontin associated with polymorphisms in its gene are a risk factor for development of autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood* 103:1376-82, 2004.

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

-International Congress of Immunology, Montreal, Luglio 2004