

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

**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
(XIX ciclo)**

Relazione 1° anno

**“RICERCA DI NUOVI GENI COINVOLTI
NELLA PATOGENESI DELL’ALPS:
analisi dell’espressione genica in linfociti T
mediante approccio proteomico”**

Massimo Ferretti

Responsabile del progetto:
Prof. Umberto Dianzani

INTRODUZIONE I

La risposta immunitaria.

La risposta immunitaria specifica coinvolge linfociti B e T attivati dal riconoscimento di antigeni estranei non-self. I linfociti B riconoscono la maggior parte delle molecole solubili nella loro forma nativa, mentre i linfociti T riconoscono frammenti peptidici processati e presentati dal complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) espresso sulla superficie di cellule presentanti l'antigene (APC), quali macrofagi, cellule dendritiche e linfociti B. Il riconoscimento dello specifico epitopo antigenico verso cui è reattivo un linfocita, tuttavia, non è sufficiente ad attivare il linfocita verso di esso, ma è necessario un secondo segnale derivato da molecole costimolatorie. La sola stimolazione dovuta al primo dei due segnali induce energia cellulare o apoptosi e la tolleranza periferica verso gli antigeni self. Il secondo segnale è trasmesso ai linfociti T dalle cellule APC tramite segnali infiammatori e ai linfociti B da linfociti T attivati che riconoscono l'antigene presentato dalle cellule B stesse. Questo sistema fa sì che la risposta immunitaria specifica sia attivata esclusivamente in un contesto infiammatorio (ovvero di danno cellulare), il che riduce la possibilità dello sviluppo di aggressioni contro il self.

L'attivazione linfocitaria è accompagnata da modifiche di espressione di molti geni che codificano per molecole di superficie coinvolte nella proliferazione e nelle funzioni effettrici dei linfociti, che garantiscono l'espansione clonale dei linfociti antigene-specifici e la loro differenziazione in cellule esecutrici (plasmacellule, linfociti T citotossici, ecc.). Ruolo importante dell'attivazione è anche lo stimolo all'espressione di molte molecole coinvolte in seguito nello spegnimento della risposta immunitaria. Tale evento si verifica tramite l'induzione di apoptosi di gran parte delle cellule effettrici, ma mantenendo un piccolo pool di cellule memoria, a garantire una più veloce ed efficace risposta nel caso in cui venga nuovamente incontrato lo stesso antigene.

Il ruolo dello spegnimento della risposta immunitaria è cruciale per controllare l'espansione del corredo linfocitario periferico, che rimane pressoché invariato grazie all'eliminazione delle cellule effettrici e alla diminuzione del corredo di cellule linfocitarie naive compensata dalla moderata espansione delle cellule memoria. Questo sistema di controllo garantisce che non vi sia un accumulo di cloni linfocitari negli organi linfoidi

secondari e che tale accumulo funzioni da fattore promuovente lo sviluppo di reazioni autoimmuni e di neoplasie linfocitarie.

E' inoltre noto come il processo di spegnimento della risposta immunitaria risulta cruciale per ridurre il rischio di autoimmunità derivate dalla cross-reattività tra alcuni antigeni non- self e self. Il modello del mimetismo molecolare assume infatti che la cross-reattività giochi un ruolo fondamentale nelle malattie autoimmuni ed è basato sul fatto che molte proteine di origine virali possiedono al loro interno sequenze peptidiche molto simili a quelle delle proteine self. Tale modello assume quindi che, una volta eliminato l'agente estraneo, il sistema immunitario possa continuare ad agire contro le molecole self cross-reattive e indurre malattie autoimmuni, evitando il controllo sopra descritto. La capacità di poter spegnere la risposta immunitaria è quindi importante per diminuire il rischio di sviluppare autoimmunità.

Nel sistema immunitario, l'apoptosi è il meccanismo principale con cui i linfociti in maturazione negli organi linfoidei primari vengono sottoposti alla selezione negativa per eliminare cellule potenzialmente autoreattive. L'induzione di apoptosi è anche il meccanismo preferenziale che viene attivato dalle cellule citotossiche contro le cellule bersaglio. La fisiologia dell'apoptosi prevede l'autodigestione controllata della cellula che innesca la propria morte programmata attivando una cascata di proteasi endogene. Questo porta al rimaneggiamento del citoscheletro, vescicolazione della membrana, condensazione e frammentazione nucleare ed espressione di molecole bersaglio per i macrofagi tissutali. Prima di essere fagocitate inoltre le cellule apoptotiche si scindono in vescicole, chiamate corpi apoptotici, mantenendo l'integrità della membrana plasmatica evitando la dispersione del contenuto citoplasmatico.

Autoimmunità e Fas (1-11).

Poiché lo spegnimento della risposta immunitaria è cruciale sia per l'omeostasi del corredo linfocitario periferico, sia per diminuire il rischio di sviluppare autoimmunità, risulta evidente che difetti intrinseci di tale sistema, possono essere causa di malattie caratterizzate dall'accumulo di linfociti in organi linfoidi secondari e reazioni autoimmuni.

Le malattie autoimmuni si possono genericamente dividere in due categorie: organo specifiche e sistemiche.

Se la risposta immunitaria è diretta contro un antigene bersaglio espresso selettivamente da un organo o un tessuto, allora si avrà una sindrome autoimmune organo-specifica; si parlerà invece di malattia sistemica se la reazione autoimmunitaria è diretta contro antigeni espressi da più organi o tessuti.

Dal punto di vista del meccanismo patogenetico, le malattie autoimmuni possono essere invece differenziate fra mediate da anticorpi o mediate da cellule. Le prime comprendono malattie come il lupus eritematoso sistemico, causato dalla precipitazione in vari tessuti di immunocomplessi. Fra le malattie autoimmuni cellulo-mediate possono essere prese ad esempio il diabete mellito di tipo 1 e la sclerosi multipla, in cui popolazioni linfocitarie Th e Tc aggrediscono rispettivamente le cellule b-pancreatiche e la mielina del sistema nervoso centrale.

Molte malattie autoimmuni presentano quadri tipici di predisposizione genetica, evidenziando la possibilità di una loro origine multifattoriale, data dal fatto che più geni differenti possano influire sulla suscettibilità genetica alla malattia, nonché allo sviluppo stesso.

Un fattore genetico ereditario che è stato chiamato in causa come responsabile nello sviluppo di sindromi autoimmuni è il difetto funzionale del sistema Fas. Fas è un recettore di membrana in grado di predisporre la cellula verso la sua morte cellulare programmata, ed è espresso da linfociti attivati, risultando quindi importante nello spegnimento della risposta immunitaria e nella deplezione delle cellule effettrici che vengono espanse durante la risposta immunitaria. Una mancata o ridotta funzionalità del sistema Fas mediato, risulta quindi essere importante nello sviluppo di malattie autoimmuni.

L'associazione tra il sistema Fas e l'autoimmunità è stata per la prima volta osservata in topi omozigoti per i caratteri *lpr* e *gld*, portatori rispettivamente di mutazioni nel gene di Fas e FasL, i quali sviluppano un quadro autoimmune/linfoproliferativo con linfadenopatia, splenomegalia e autoimmunità a carattere sistemico, prevalentemente rivolte verso cellule del sangue. In più essi evidenziano una periferica espansione di cellule linfocitarie che mancano sia di CD4, molecola marcatrice delle popolazioni T helper, che di CD8, marcatore delle T citotossiche, e definite per questo cellule doppie negative (DN).

Negli esseri umani, un simile quadro sintomatico è osservabile in pazienti affetti da ALPS (sindrome autoimmune linfoproliferativa), precedentemente conosciuta come Sindrome di Canale-Smith. ALPS è una malattia con insorgenza pediatrica i cui sintomi diagnostici sono riconducibili a A) massicce reazioni autoimmuni prevalentemente rivolte verso cellule del sangue come anemie emolitiche o trombocitopenie, B) accumulo policlonale di linfociti B e T che sono causa di linfadenopatia e splenomegalia a carattere non-neoplastico e C) espansione periferica di linfociti T DN.

Dal punto di vista molecolare l'ALPS può essere diagnosticato dalla marcata resistenza dei linfociti del paziente allo stimolo apoptotico indotto dal sistema Fas.

Il sistema Fas (12-14).

Il recettore Fas (Apo1/CD95) è una glicoproteina transmembrana di 45/48 kDa di tipo I appartenente alla famiglia dei recettori per il TNF, molecole in grado di indurre morte cellulare programmata attivando la cascata delle CASPASI (proteasi cisteina-dipendenti aspartato-specifiche). Il recettore Fas è caratterizzato da tre domini ricchi in cisteina (CRDs) nel dominio extracellulare e da una sequenza citosolica di 80 aa chiamato death domain (DD), in grado di interagire con altri domini DDs presenti su altre proteine. Il suo ligando naturale, FasL è una proteina trimerica di superficie di tipo II, che può essere rilasciata in forma solubile tramite una digestione mediate da metalloproteinasi.

Il sistema Fas/FasL è il sistema meglio caratterizzato nello spegnimento della risposta immunitaria. I linfociti T citotossici uccidono il loro bersaglio attivandone l'apoptosi grazie all'interazione fra il FasL presente sulla loro membrana plasmatica e il recettore Fas presente sulla superficie delle cellule bersaglio. Inoltre l'attivazione dei linfociti fa sì che essi comincino ad esporre grandi quantitativi di recettore Fas, diventando così suscettibili alla loro regolazione negativa da parte di altri linfociti o altre cellule che esprimono FasL.

Le caspasi (15-17).

Le caspasi sono una famiglia di proteasi in grado di idrolizzare proteine bersaglio in corrispondenza di una sequenza consenso contenente acido aspartico ed hanno un sito attivo ricco di residui di cisteina. Le caspasi sono coinvolte in differenti aspetti della morte cellulare programmata, idrolizzando precursori di citochine al fine di attivarli, innescando la propagazione di segnali apoptotici e realizzando il programma apoptotico mediante l'attivazione di processi trascrizionali e mediante scissione diretta di proteine fondamentali per la cellula. Le caspasi coinvolte nella cascata del segnale indotta da Fas, possono essere suddivise in iniziatrici, che agiscono nella prima fase del processo ed hanno effetto reversibile, ed effettrici, irreversibilmente coinvolte nel processo apoptotico.

Tutte le caspasi sono sintetizzate sotto forma di precursori inattivi, che vengono attivati grazie al taglio proteolitico, autocatalitico o mediato da altre caspasi, della porzione inibitoria del precursore.

Trasduzione del segnale Fas mediata (18-30).

Il segnale apoptotico indotto dal sistema Fas può essere suddiviso in due vie fra loro ben differenziate: la via estrinseca, in cui viene direttamente coinvolta l'attivazione della cascata delle caspasi, ed una via intrinseca, che invece coinvolge il mitocondrio.

Nella via estrinseca, il legame ligando-recettore induce la formazione di un composto trimolecolare denominato DISC (death inducing signaling complex), nel quale Fas e la molecola adattatrice FADD (Fas associated death domain) interagiscono direttamente tramite i loro domini DD, e FADD recluta le procaspasi-8/10 tramite un motivo di interazione proteina-proteina chiamato DED (death effector domain). La formazione del DISC permette la digestione autocatalitica delle procaspasi-8/10 ed il rilascio delle caspasi attive sotto forma di eterotetrameri formati da due subunità grandi e due piccole. Le caspasi iniziatrici così attivate avviano la cascata del segnale fino all'attivazione delle caspasi effettrici 3,6,7, che guidano il programma di morte cellulare. La caspasi-8 agisce anche da ponte per collegare la via estrinseca con quella intrinseca. Fra i suoi substrati, infatti, è presente la proteina citosolica Bid, molecola pro-apoptotica

appartenente alla famiglia di Bcl-2, che, una volta clivata dalla caspasi-8, rilascia un frammento (tBid) in grado di traslocare nel mitocondrio e attivare il processo intrinseco. Il processo di attivazione del segnale Fas mediato è in grado, inoltre, di attivare delle sfingomielinasi acide e produrre ceramide, in grado di alterare la membrana mitocondriale, attraverso la produzione di GD3 ganglioside.

L'evento fondamentale del processo mediato dal frammento tBid e dalla ceramide è l'alterazione della permeabilità del mitocondrio con il conseguente rilascio del citocromo c. Il citocromo c così diffuso, si lega alla molecola adattatrice APAF-1 (apoptotic protease-activating factor-1) rendendola in grado di reclutare la procaspasi-9. Viene così a formarsi un complesso multimolecolare costituito da APAF-1, citocromo c, dATP e procaspasi-9 chiamato apoptosoma.

Come accade per il DISC, la formazione dell'apoptosoma permette l'attivazione della caspasi 9, tramite taglio autocatalitico, e la conseguente attivazione delle caspasi effettrici.

Inibitori della trasduzione del segnale dipendente da Fas (31-41).

Molte proteine inibitrici appartenenti alle famiglie FLIP, IAP e Bcl2 agiscono sulla cascata del segnale indotta da Fas a differenti livelli della cascata. La proteina c-FLIP, con le sue due forme C-FLIPs (short) e c-FLIP1 (long), interagisce con l'adattatore FADD o direttamente con la procaspasi-8 grazie a due domini DEDs (la forma l possiede anche un dominio caspasi-simile omologo a quello della caspasi-8), ma mancando di attività catalitica è in grado di bloccare la formazione del corretto DISC e quindi blocca l'attivazione della caspasi-8 stessa. Alti livelli di c-FLIP sono rilevabili in linfociti quiescenti e nelle prime fasi di attivazione sono correlate con la resistenza di queste cellule all'induzione Fas-mediata di apoptosi. Nelle fasi più avanzate dell'attivazione linfocitaria, l'espressione basale di c-FLIP viene a calare sensibilmente, rendendo così i linfociti suscettibili all'azione del sistema Fas/FasL.

I membri della famiglia delle IAPs (c-IAP1, C-IAP2 e XIAP) agiscono sequestrando le caspasi grazie alla presenza di domini BIR (baculovirus inhibitor repeat), in particolare bloccando l'azione delle caspasi-3, -7 e -9. Tra queste molecole quella che riveste maggior interesse è XIAP che è in grado di inibire l'attivazione della caspasi-9 e bloccare l'azione della caspasi-3 già attivata.

La regolazione della cascata delle caspasi attuata dall'azione delle IAPs, è a sua volta finemente regolata tramite una proteina mitocondriale denominata Smac (DIABLO), che, in seguito a stimoli apoptotici, viene rilasciata nel citosol in contemporanea alla diffusione del citocromo c. In tal modo, mentre il citocromo c si lega ad APAF-1 e porta alla formazione dell'apoptosoma, Smac inattiva le IAPs agevolando l'attivazione delle caspasi -3 e -9.

La famiglia di Bcl-2 comprende diverse molecole ad azione anti-apoptotica (Bcl-2 e Bcl-XL) o pro-apoptotica (Bax, Bcl-XS, BAK). I vari membri di questa famiglia possono formare omodimeri (es. Bcl2/Bcl2), oppure eterodimeri, interagendo con altre molecole della stessa famiglia (Bcl2/Bax), e il grado di omeostasi che si viene a creare fra queste differenti interazioni, ne regola l'attività pro- o anti- apoptotica.

INTRODUZIONE II

Proteomica (42-46).

Il termine PROTEOMA è stato introdotto recentemente per indicare tutte le proteine presenti in un organismo in un certo SPAZIO ed in un certo MOMENTO, inclusi tutti i prodotti secondari dovuti alle modifiche co- e post- traduzionali dello stesso gene.

L'attenzione allo spazio considera il fatto che sono presenti differenti proteine in differenti tipi o compartimenti cellulari. L'attenzione al tempo considera che la composizione e la concentrazione delle proteine sia legata allo stadio ed allo sviluppo embrionale, all'età o ad un particolare processo fisiologico o patologico in corso nella cellula.

Il proteoma, cambia quindi, da cellula a cellula sia qualitativamente che quantitativamente, oltre che in funzione del tempo e delle condizioni ambientali in cui si trova la cellula, e varia dinamicamente in virtù del fatto che i geni possono essere processati in modo diverso e dare origine a proteine differenti. Inoltre modificazioni co- e post- traduzionali, che non possono essere predette dalla sequenza genetica, determinano la formazione di diverse isoforme dello stesso prodotto.

Determinare la funzione di un gene significa quindi determinare le caratteristiche chimiche, biochimiche e biologiche della proteina dallo stesso codificata. Queste caratteristiche includono oltre alla struttura molecolare della proteina, le modificazioni che può subire, il suo grado di sintesi o di degradazione, nonché la sua concentrazione a livello cellulare.

Le tecniche che attualmente permettono di separare le differenti isoforme proteiche generate da modificazioni fisiologiche o patologiche ed il loro riconoscimento sono rispettivamente l'elettroforesi bidimensionale (2D-PAGE) e la spettrometria di massa.

Elettroforesi bidimensionale (47-49)

L'elettroforesi bidimensionale è il metodo attualmente più potente che permette di separare contemporaneamente centinaia di proteine ed ottenere informazioni circa la loro massa molecolare, il punto isoelettrico e la loro concentrazione all'interno del campione.

Questa tecnica è in grado di risolvere e separare le proteine, isoforme comprese, estratte da cellule, organi, tessuti o fluidi biologici.

E' entrata nell'uso comune con l'affermarsi di un metodo che combinava una isoelettrofocalizzazione (IEF), come prima dimensione orizzontale, con una elettroforesi denaturante su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE), come seconda dimensione verticale.

In questo modo i polipeptidi del campione in esame vengono separati in base a due differenti proprietà molecolari: la loro carica nella prima dimensione, ed il loro peso molecolare nella seconda.

L'elettroforesi bidimensionale ha trovato ampia diffusione in questi ultimi anni grazie ad importanti innovazioni quali:

- Nuove tecniche di separazione più efficienti (soprattutto per quanto riguarda la prima dimensione);
- La disponibilità di computer e software sempre più sofisticati che permettono valutazioni efficienti delle corse elettroforetiche 2D;
- L'accesso diretto a database con pattern di corse elettroforetiche 2D derivanti da differenti sorgenti;
- Sviluppo di metodi estremamente sensibili per l'identificazione delle proteine separate mediante 2D-PAGE quali ad esempio metodi di spettrometria di massa come la MALDI-TOF.

Spettrometria di massa (50,51).

La spettrometria di massa consiste in un insieme di tecniche analitiche, particolarmente usate in chimica organica, che consentono di misurare le masse molecolari e di determinare quindi la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

Una molecola però, per poter essere osservata e misurata nelle sue proprietà di massa, deve essere prima ionizzata.

Per ottenere uno spettro di massa, infatti, il requisito essenziale è di produrre degli ioni in fase gassosa che saranno successivamente accelerati fino a raggiungere una velocità specifica mediante un campo elettrico, e poi proiettati in un analizzatore di massa

appropriato che separa entità di masse diverse ed infine, rivelare ogni composto dotato di carica e con una certa massa sequenzialmente nel tempo. Mediante la spettrometria di massa è possibile studiare qualsiasi tipo di composto che sia in grado di essere ionizzato, e i cui ioni possano esistere in fase gassosa. Questa tecnica, quindi, risulta completamente diversa dagli altri comuni metodi analitici. A differenza delle tecniche spettroscopiche, essa è un metodo d'analisi distruttivo (la molecola non rimane intatta dopo l'analisi), e soprattutto non si basa sull'interazione tra radiazioni e materia.

In base al tipo di sorgente utilizzata la ionizzazione primaria del campione viene realizzata in vario modo; le tecniche più utilizzate sono:

- impatto elettronico (E.I.)
- ionizzazione chimica (C.I.)
- bombardamento con atomi veloci (F.A.B.)
- desorbimento con laser (M.A.L.D.I.)
- electrospray (E.S.I.)

MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONISATION (M.A.L.D.I.)

Questa tecnica è basata essenzialmente sulla ionizzazione per desorbimento con laser. In questa tecnica gli analiti sono associati a matrici che vengono poi soggette ad irradiazione con un laser. La differenza rispetto ad altri processi, consiste nel processo di allontanamento dello ione della matrice; nella MALDI è l'irradiazione con laser che permette ad un numero più ristretto di molecole posta sulla superficie delle matrici di essere proiettata ad alte velocità nell'analizzatore. In genere questa tecnica viene associata a spettrometri basati sul principio del tempo di volo (Time of Flight, T.O.F.). Il TOF invece di operare una deflessione magnetica, opera un'accelerazione lineare che può essere monitorata e studiata.

Questo tipo di spettrometro separa gli ioni in base al tempo necessario per compiere un determinato percorso. All'uscita dal campo elettrico, gli ioni possiedono la stessa energia cinetica, ma una diversa velocità a seconda del rapporto massa/carica. Lasciandoli correre perciò in una regione libera da campi (un tubo sotto vuoto spinto) essi raggiungeranno il rivelatore in tempi diversi. Il tempo di volo è quindi, inversamente proporzionale alla massa.

Il campione è dissolto in un'adatta matrice solvente.

- a) Irradiazione mediante laser delle molecole della miscela (matrice - analita).
- b) Espulsione di un aggregato di analita solvatato dalle molecola di matrice.
- c) Desolvatazione con conseguente trasferimento di un protone (reazione acido-base tra matrice e analita).

Il processo ora può andare in due direzioni potremo analizzare molecole cariche positivamente o negativamente a seconda del processo avvenuto. In genere si ha il trasferimento di un protone dalla matrice all'analita.

PREMESSE E SCOPO

Benchè molto si conosca riguardo alla sindrome autoimmune linfoproliferativa, la ricerca di nuovi geni e prodotti proteici coinvolti nello sviluppo della malattia rimane un punto interessante da sviluppare. Infatti, risultano molto pochi i geni che si sono potuti associare direttamente alla malattia e che sono stati finora caratterizzati. Un ampio gruppo di casi è stato riunito in quella che viene definita ALPS 1 e che presentano tutte alterazioni geniche a carico del gene codificante per il recettore Fas, mentre nella patogenesi della sindrome ALPS 2 le alterazioni sono a carico del gene codificante per la caspasi-10.

Rimane tuttavia un grande gruppo di casi (ALPS 3), in cui le alterazioni geniche coinvolte non sono ancora state identificate. In questo ambito, il nostro laboratorio ha individuato una sindrome ALPS-simile, definita DALD (*Dianzani's Autoimmune lymphoproliferative disease*) che, pur manifestando sintomi diagnostici identici all'ALPS, manca dell'espansione periferica dei linfociti DN. Anche nei pazienti DALD non sono ancora stati identificati geni coinvolti nella patogenesi (52-56).

Pur non essendo correlati con lo sviluppo di ALPS, tuttavia, sono state identificate alterazioni a carico di geni codificanti per proteine coinvolte nella trasduzione del segnale apoptotico Fas mediato. E' stato individuato un paziente, inizialmente sospetto ALPS, nel quale era presente una alterazione a carico del gene codificante per il FasL. Il paziente non è poi risultato essere affetto da ALPS per via dell'età di diagnosi (il paziente era già in età adulta) e della mancanza di molti sintomi caratteristici della malattia. Una seconda mutazione a carico invece del gene codificante per la caspasi-8, è stata invece ritrovata in un paziente affetto da immunodeficienza e i cui linfociti non rispondevano all'attivazione indotta da stimoli antigenici.

L'esistenza di tali alterazioni in proteine coinvolte nella trasduzione del segnale Fas mediato ci fa supporre che nella patogenesi di ALPS o DALD, possano essere coinvolti più fattori. Un supporto a tale idea viene direttamente dall'analisi di alcuni quadri familiari di

pazienti ALPS 1. In questi quadri si può notare come il paziente abbia ereditato la mutazione per il recettore Fas in eterozigosi, da uno dei due genitori, il quale però, pur essendo resistente ad apoptosi indotta da Fas, è pur sempre sano, ed una seconda mutazione ancora sconosciuta dall'altro genitore, che, pur avendo il gene codificante per Fas non alterato, risulta essere anch'egli resistente ad apoptosi, purchè sano.

Con queste premesse lo scopo del progetto di dottorato si focalizza sull'individuazione di possibili geni candidati coinvolti nella patogenesi della malattia (ALPS/DALD), e verrà condotto secondo approccio proteomico.

Nelle prime fasi del progetto, si verterà l'attenzione alle prime fasi della trasduzione del segnale apoptotico indotto da Fas, ed in particolare alla ricerca di alterazioni a carico di proteine coinvolte nella formazione del DISC e nella sua corretta regolazione. A tale scopo il metodo di indagine che si è scelto di seguire prevede come punti focali:

- L'individuazione dei pazienti resistenti ad apoptosi indotta da Fas;
- La caratterizzazione dei pazienti resistenti in base al livello di attività della caspasi-8;
- La coimmunoprecipitazione del complesso recettore/DISC;
- L'analisi proteomica dei campioni ottenuti tramite elettroforesi bidimensionale e MALDI-TOF.

L'individuazione dei pazienti resistenti a Fas viene condotta ormai di routine nel nostro laboratorio, e consiste nel saggiare la sensibilità o resistenza all'apoptosi dei PBM (mononucleati di sangue periferico) purificati dei pazienti. Questo semplice test viene effettuato utilizzando un anticorpo anti-Fas in grado di mimare l'interazione fra ligando e recettore. Un indice di sopravvivenza cellulare superiore ad un cut-off del 82%, permette di discriminare pazienti resistenti da quelli sensibili.

Una volta individuati i pazienti, verrà saggiata l'attività della caspasi-8 tramite uno specifico kit di attività caspasi-8. Essendo la caspasi-8 il prodotto diretto del DISC funzionale, individuare pazienti la cui attività di caspasi-8 risulta ridotta o assente, ci permetterà di restringere il bersaglio di una eventuale alterazione alle proteine coinvolte nella formazione o regolazione del DISC stesso.

Caratterizzati così i pazienti e scelti opportuni controlli, si procederà con la coimmunoprecipitazione del recettore Fas e del DISC. Tale metodologia è resa possibile grazie all'utilizzo di un anticorpo agonista anti-Fas, in grado di stimolare la formazione del

DISC ed al tempo stesso di immunoprecipitare l'intero complesso proteico. Una volta controllati i campioni ottenuti da pazienti e controllo tramite Western Blot con anticorpi primari diretti verso proteine note (es. caspasi-8, FADD), si passerà all'analisi proteomica.

In particolare i campioni verranno sottoposti alla separazione con elettroforesi bidimensionale che permetterà di individuare eventuali differenze fra pazienti e controlli, quali:

- Proteine con livello di espressione significativamente differente fra i due pattern;
- Assenza di bande proteiche nei pattern dei pazienti rispetto ai controlli;
- Differente migrazione di una stessa proteina nelle due corse elettroforetiche;
- Comparsa di nuove bande proteiche nei pattern dei pazienti, non presenti nei controlli.

Questi dati verranno inoltre supportati da analisi proteomiche come il confronto con database 2D presenti in rete o tramite analisi con spettrometria di massa MALDI-TOF (condotta in collaborazione con il laboratorio del Prof. Davoli dell'istituto "Mario Negri" di Milano).

I dati finali potranno così dare indicazione di possibili nuovi geni candidati alla patogenesi di ALPS / DALD, su cui si potranno poi allestire nuovi esperimenti (es. sequenziamento su genoma, clonaggi, etc.).

BIBLIOGRAFIA

1. Goldsby R.A., Kindt T.J. and Osborne B.A. *Kuby Immunologia*. 2nda Edizione 2000.
2. 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.
3. Fisher GH, Rosemberg FJ, Straus SE, Dale JK, Middleton LA, Lin AY, Strober W, Lenardo MJ and Puck JM. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome., *Cell.*, 81:935-946, 1995.
4. Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome., *Ann Intern Med.*, 130(7): 591-601, 1999.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Fleisher TA, Puck JM, Strober W, Dale JK, Lenardo MJ, Siegel RM, Straus SE, Bleesing JJ. The autoimmune lymphoproliferative syndrome. A disorder of human lymphocyte apoptosis. *Clin Rev Allergy Immunol.*, 20(1):109-20, 2001.
9. Jackson CE, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr Opin Pediatr.*, 11(6):521-527, 1999.
10. 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.

11. 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.*, 93(1):34-45, 1999.
12. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.*;267:1449-1456, 1995.
13. O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege. *Immunol Today.* 20(1):46-52, 1999
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 Cellule 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.*, 288(5475):2354-2357, 2000.
17. 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.
18. Gomez-Angelats M, Cidlowski JA. Protein Kinase C Regulates FADD Recruitment and Death-inducing Signaling Complex Formation in Fas/CD95-induced Apoptosis. *J Biol Chem.* 276(48):44944-44952, 2001.
19. J.P. Medema, C. Scaffidi, F.C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter, FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC), *The EMBO Journal* 16 n. 10: 2794-2804, 1997.
20. M. Los, C. Stroh, R. U. Janiche, I. H. Engels, K. Schulze-Osthoff Caspases: more than just killers? *Trends in Immunology* Vol.22 No.1, 2001.
21. Hofmann TG, Moller A, Hehner SP, Welsch D, Droge W, Schmitz ML. CD95-induced JNK activation signals are transmitted by the death-inducing signaling complex (DISC), but not by Daxx. *Int J Cancer.* 93(2):185-191, 2001.
22. Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem.* 276(23), 2001.

23. 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*. 81(4):505-512, 1995.
24. S. Desagher, J.C. Martinou, Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trend in Cell Biology* (vol. 10), 2001.
25. De Maria R., Lenti L., Malisan F. et al.: Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 277, 1652-1655, 1997.
26. De Maria R, Rippo MR, Schuchman EH et al.: Acidic sphingomyelinase (ASM) is necessary for fas-induced GD3 ganglioside accumulation and efficient apoptosis of lymphoid cells. *J Exp Med* 187, 897-902, 1998.
27. Hu Y., Benedict M.A., Wu D. et al.: G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4386-4391, 1998
28. Li P., Nijhawan D., Budihardjo I. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489, 1997.
29. C. Scaffidi, S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tommaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer, M.E. Peter, Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways, *The EMBO Journal* 17 n.6: 1675-1687, 1998.
30. Chiocchetti A., Dianzani U. Role of Fas defects in autoimmunity. *Res. Adv. In Blood*, 2001.
31. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. Aug 1;13(15):1899-911, 1999.
32. 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.
33. Cheng E.H., Kirsch D.G., Clem R.J. et al.: Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966-1968, 1997.
34. 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.
35. 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.
36. 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.

37. 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.
38. Ambrosini G., Adida C., Altieri D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917-921, 1997.
39. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*;102(1) :33-42, 2000.
40. Verhagen A.M et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*;102:43-53, 2000.
41. Wu G, Chai J, Suber TL, WU JW, Du C, Wang X, Shi Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO *Nature.*; 408(6815):1008-1012, 2000.
42. Wasinger, V.C. et al. Progress with gene-production mapping of the mollicutes : mycoplasma genitalium. *Electrophoresis* 16, 1090-1094 (1995)
43. Williams, K.L. Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology. *Electrophoresis* 20, 678-688 (1999)
44. Williams, K.L. and Hochstrasser, D.F. Proteome research: new frontiers in functional genomics, cap 1 ed. Springer (1997)
45. Klose, J. et al. Genotypes and phenotypes. *Electrophoresis* 20, 643-652 (1999)
46. Hughes, G.J. et al. Plasma protein map: an update by microsequencing. *Electrophoresis* 13, 707-714 (1992)
47. O'Farrel, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.* 250, 4007-4021 (1975)
48. Klose, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissue. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik* 26,231-243 (1975)
49. Gorg, A. et Al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradient. *Electrophoresis* 21, 1334-1336 (1967)
50. Figeys, D. Electrophoresis combined with a novel mass spectrometry techniques: powerful tools for the analysis of proteins and proteomics. *Electrophoresis* 19, 1811-1818 (1998)
51. Blackstock, W. trends in automation and mass spectrometry for proteomics. *Proteomics: a trend guide* 12-17 (2000)
52. Jackson CE, Fischer RE, Hsu Ap et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with defective Fas: genotype influences penetrance. *Am J Hum Gen.*;64:1002-1014, 1999.

53. Van Der Werff Ten Bosch J, Otten J, Thielemans K. Autoimmune lymphoproliferative syndrome type III: an indefinite disorder. *Leuk Lymphoma.*, 41(1-2):55-65, 2001.
54. Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, Alliaudi C, Scagni P, Buofiglio D, Redoglia V, Bonisconi S, Corra A, Dianzani I, Ramenghi U. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferations., *Blood.*, 89:2871-2879, 1997.
55. Dianzani U, Chiocchetti A, and Ramenghi U. Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sciences.*;72:2803-2824, 2003.
56. Ramenghi U, Bonisconi S, Migliaretti G, et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood.*;95:3176-3182, 2000.

Corsi/Congressi seguiti:

- “Corso di Elettroforesi Bidimensionale”. 28/29 settembre 2004. Palazzo LITA, Istituto Tecnologie Biomediche Avanzate (ITBA), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Fratelli Cervi 93, Segrate (MI).

Seminari seguiti dal 1-4-04

- 3-5-04 “Genetic bases of the ALPS subtypes”, Frederic Rieux-Laucat;
- 11-5-04 “Seminario conclusivo del corso di bioetica”, Università degli Studi di Milano;
- 20-5-04 “Le artriti croniche del bambino”, Alberto Martino;
- 28-5-04 “Il reticolo endoplasmatico: un labirinto metabolico”, Angiolo Benedetti;
- 11-6-04 “Virus e malattie autoimmuni”, Antonio Puccetti;
- 14-6-04 “Biomedical discovery using microarray: principles, prospects and problems”, David Murphy;
- 14-6-04 “Pitfalls of genetic studies in liver diseases”, Christopher Day;
- 15-6-04 “Functional genomics of hypothalamic homeostatic plasticity”, David Murphy.