

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”  
Facoltà di Medicina e Chirurgia



**Dottorato di Ricerca  
in  
Medicina Molecolare**

*Ciclo XIX*

**(2004-2008)**

*“Identificazione e caratterizzazione di mutazioni coinvolte nello sviluppo di malattie autoimmuni”*

**Relatore:** Prof. Umberto Dianzani

**Candidato:** Massimo Ferretti

## INDICE DELLA TESI

INDICE DELLA TESI	<i>pag.1</i>
1. AUTOIMMUNITA'	<i>pag.3</i>
1.1    Eziologia e patogenesi delle malattie autoimmuni.	<i>pag.3</i>
1.2    Predisposizione genetica.	<i>pag.5</i>
1.3    Associazione col sesso.	<i>pag.6</i>
1.4    Associazione con l'aplotipo HLA	<i>pag.7</i>
1.5    Autoimmunità e difetti ereditari della funzione di Fas: la sindrome autoimmune linfoproliferativa.	<i>pag.8</i>
1.6    Il modello dei topi <i>lpr</i> e <i>gld</i> .	<i>pag.8</i>
1.7    La sindrome autoimmune/linfoproliferativa.	<i>pag.9</i>
1.8    La malattia autoimmune/linfoproliferativa di Dianzani (DALD), una variante di ALPS.	<i>pag.10</i>
1.9    Coinvolgimento dei difetti funzionali di Fas nello sviluppo di malattie autoimmuni comuni.	<i>pag.13</i>
1.10   Altri sistemi coinvolti nello sviluppo di quadri autoimmuni/linfoproliferativi.	<i>pag.13</i>
2. RUOLO DELL'APOPTOSI NEL SISTEMA IMMUNITARIO	<i>pag.14</i>
2.1    Maturazione dei linfociti negli organi linfatici primari (tolleranza centrale).	<i>pag.14</i>
2.2    Tolleranza periferica.	<i>pag.15</i>
2.3    Attività citotossica cellulo-mediata.	<i>pag.16</i>
2.4    Spegnimento della risposta immune.	<i>pag.17</i>
3. I RECETTORI DI MORTE	<i>pag.19</i>
3.1    Il sistema Fas/FasL.	<i>pag.19</i>
3.2    Il segnale apoptotico: le caspasi.	<i>pag.20</i>
3.3    La cascata di trasduzione del segnale apoptotico.	<i>pag.21</i>
4. GLI INIBITORI DEL SEGNALE APOPTOTICO	<i>pag.23</i>
4.1    XIAP: struttura e funzione.	<i>pag.24</i>
4.2    Il modello murino.	<i>pag.27</i>
5. SCOPO DELLA TESI	<i>pag.28</i>
6. DIABETE MELLITO DI TIPO 1	<i>pag.29</i>
6.1    Eziologia e patogenesi.	<i>pag.29</i>
6.2    T1DM e sistema Fas/FasL.	<i>pag.31</i>
6.3    Scopo del lavoro.	<i>pag.33</i>
6.4    Materiali e Metodi.	<i>pag.33</i>

6.5	Risultati.	<i>pag.36</i>
6.6	Discussione.	<i>pag.46</i>
7.	XIAP E MALATTIE AUTOINFIAMMATORIE	<i>pag.49</i>
7.1	Sindromi da Febbre Ricorrente.	<i>pag.49</i>
7.2	XIAP e sindromi da Febbre Ricorrente.	<i>pag.51</i>
7.3	Scopo.	<i>pag.51</i>
7.4	Materiali e Metodi.	<i>pag.52</i>
7.5	Risultati.	<i>pag.56</i>
7.6	Discussione.	<i>pag.69</i>
8.	XIAP E ALPS	<i>pag.73</i>
8.1	XIAP e linfoproliferazione.	<i>pag.73</i>
8.2	Scopo.	<i>pag.75</i>
8.3	Materiali e Metodi.	<i>pag.76</i>
8.4	Risultati.	<i>pag.79</i>
8.5	Discussione.	<i>pag.91</i>
9.	BIBLIOGRAFIA	<i>pag.96</i>

# 1. L'AUTOIMMUNITA'

## 1.1 *Eziologia e patogenesi delle malattie autoimmuni.*

Agli inizi del '900 Paul Ehrlich si accorse che il sistema immunitario poteva reagire in modo errato dirigendo il proprio attacco contro antigeni autologhi (*self*) invece che contro antigeni estranei.

Oggi sappiamo che i sistemi di tolleranza al *self*, che normalmente proteggono ciascun individuo dai linfociti potenzialmente autoreattivi, possono in certi casi fallire. Questi fallimenti portano allo sviluppo di una risposta inappropriata del sistema immunitario contro tessuti *self*, fenomeno detto autoimmunità.

Negli anni '60 si riteneva che tutti i linfociti autoreattivi fossero eliminati durante la maturazione linfocitaria e che le malattie autoimmuni fossero dovute ad errori nel processo di delezione dei cloni pericolosi.

A partire dalla fine degli anni '70 sono state ottenute numerose evidenze sperimentali in contrasto con questo modello. Infatti, linfociti autoreattivi maturi circolanti sono normalmente presenti nei soggetti sani normali.

La presenza di queste cellule non porta inevitabilmente allo sviluppo di manifestazioni autoimmuni e questo suggerisce che la loro attività è regolata attraverso meccanismi di anergia o soppressione clonale. L'alterazione di questi meccanismi regolatori può portare all'attivazione di cloni di linfociti autoreattivi e al conseguente sviluppo di reazioni umorali o cellulari contro antigeni *self*.

In molti casi i fattori scatenanti che determinano il passaggio da una potenziale autoreattività alla malattia autoimmune sono gli agenti infettivi, spesso di tipo virale.

Le infezioni possono scatenare la malattia attraverso vari meccanismi:

1) La presenza negli agenti infettivi di antigeni simili ad antigeni *self* (fenomeno del “mimetismo molecolare”) può determinare una reazione crociata contro il *self* da parte della risposta contro l’agente infettivo anche dopo che quest’ultimo è stato eliminato.

2) L’infezione può danneggiare i tessuti causando la liberazione di antigeni normalmente sequestrati, che non sono mai stati incontrati dal sistema immunitario e che sono quindi erroneamente riconosciuti come non *self*.

3) Infine il processo infiammatorio locale innescato dall’infezione nel tessuto, determina la produzione di citochine e l’attivazione delle cellule presentanti l’antigene (APC) aumentandone la capacità di presentare gli antigeni e le capacità costimolatorie; la presenza di questo ambiente iper-reattivo permette l’attivazione di linfociti T autoreattivi che non si sarebbero mai attivati in un contesto fisiologico.

I meccanismi appena descritti non sono mutuamente esclusivi ma intervengono insieme e probabilmente ciò determina il fenomeno conosciuto come *epitope spreading* molto frequente nelle malattie autoimmuni. Tale fenomeno spiega come, nel corso della malattia, si passi da una fase iniziale, dove la risposta immunitaria è diretta verso un singolo epitopo di una proteina, fino ad arrivare ad una risposta più vasta indirizzata sia verso epitopi diversi della stessa proteina sia contro proteine diverse.

Le malattie autoimmuni possono essere divise in due grandi categorie: quelle organo-specifiche e quelle sistemiche [1].

Nelle malattie autoimmuni organo-specifiche, la risposta immunitaria è diretta contro un antigene bersaglio espresso selettivamente da un certo organo o ghiandola, per cui le manifestazioni della malattia sono in gran parte limitate ad esso. Nelle malattie autoimmuni sistemiche la risposta è diretta contro antigeni bersaglio espressi in numerosi tessuti e coinvolge quindi più organi e tessuti.

Dal punto di vista del meccanismo immunopatogenetico, le malattie autoimmuni possono essere mediate da anticorpi oppure da cellule.

Le prime comprendono malattie come le emocitopenie autoimmuni, causate da autoanticorpi contro vari tipi di cellule del sangue, oppure il lupus eritematoso sistemico, causato dalla deposizione in vari tessuti di immunocomplessi formati principalmente da anticorpi contro complessi DNA-istoni o RNA-ribonucleoproteine e i rispettivi auto-antigeni. Fanno parte di questa categoria anche alcune malattie autoimmuni organo-specifiche causate da auto-anticorpi capaci di esercitare un'attività agonista o antagonista sull'organo bersaglio; ad esempio nel morbo di Graves-Basedow anticorpi anti-recettore del TSH causano un'iperfunzione tiroidea, mentre nella miastenia grave anticorpi contro il recettore dell'acetilcolina inibiscono la trasmissione dell'impulso neuro-muscolare.

Le malattie autoimmuni cellulo-mediate sono una categoria in continua crescita e sono mediate principalmente da linfociti T helper di tipo 1 (Th1), caratterizzati dalla produzione di citochine pro-infiammatorie, quali IL-2, IFN $\gamma$  e Linfotossina, e da linfociti T citotossici (Tc). Esempi di questo tipo di malattie autoimmuni sono il diabete mellito di tipo 1 oppure la sclerosi multipla in cui i linfociti Th1 e Tc agrediscono rispettivamente le cellule  $\beta$ -pancreatiche e la mielina del sistema nervoso centrale. In queste malattie si osserva in genere anche la produzione di autoanticorpi, che sono considerati utili marcatori dello sviluppo della malattia, ma questi sarebbero conseguenza del fenomeno dell'*epitope spreading* e avrebbero un modesto ruolo patogenetico.

### 1.2 Predisposizione genetica.

Molte malattie autoimmuni presentano un certo grado di familiarità. Questo ha indotto lo svolgimento di una enorme mole di studi volti a definire i fattori genetici coinvolti nel loro sviluppo. Nel loro complesso i dati ottenuti disegnano il quadro tipico delle malattie multifattoriali, in cui un insieme di geni diversi possono influire nella suscettibilità genetica allo sviluppo della malattia, che richiede comunque l'induzione da parte di fattori scatenanti.

Molti studi genetici hanno evidenziato l'associazione statistica di particolari malattie autoimmuni con particolari polimorfismi di specifici geni, ovvero è stato dimostrato che una certa malattia autoimmune è più frequente nei portatori di un determinato allele di un gene. Tuttavia spesso non è chiaro se questi geni siano coinvolti direttamente nello sviluppo della malattia oppure se l'associazione statistica sia 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.

Nel complesso, i fattori genetici che sono stati associati con maggiore certezza all'autoimmunità e la cui base biologica sia stata dimostrata in modo soddisfacente sono il sesso e l'aplotipo HLA.

### *1.3 Associazione col sesso.*

Numerose malattie autoimmuni hanno un diversa frequenza nel sesso femminile e in quello maschile. Molte di esse, come il lupus eritematoso sistemico, la miastenia grave, la sclerosi multipla e la sindrome di Sjögren, sono molto più frequenti nelle femmine che nei maschi. Viceversa la spondilite anchilosante è più frequente nei maschi. I motivi di questa diversa suscettibilità non sono noti con certezza, ma è probabile che un ruolo centrale sia giocato dagli ormoni sessuali. Non è chiaro se gli ormoni sessuali steroidei abbiano un'azione diretta sui linfociti, tuttavia questa possibilità è suggerita dal fatto che altri steroidi, come il cortisone, hanno un'effetto molto potente. Inoltre altri ormoni espressi diversamente nel maschio e nella femmina, come la prolattina, hanno effetto sui linfociti, come dimostrato dal fatto che il recettore per la prolattina è espresso dai linfociti sia T sia B e che la loro risposta a stimoli di attivazione è modulata in vitro da questo ormone.

E' noto, inoltre, che gli ormoni sessuali modulano notevolmente la risposta immunitaria durante la gravidanza indirizzando prevalentemente la risposta immune verso risposte di tipo Th2. Questo presenta due vantaggi: 1) favorisce le risposte anticorpali di tipo IgG, che sono

protettive per il feto dal momento che le IgG superano la barriera placentare; 2) riduce le risposte citotossiche che potrebbero invece aggredire la placenta, che può essere considerato un organo non *self*. In effetti alcune forme di aborto precoce ricorrente sono state attribuite ad una eccessiva risposta Th1 o CTL contro la placenta.

In linea con queste osservazioni la gravidanza esacerba alcune malattie autoimmuni mediate da anticorpi (e quindi favorite dai Th2), come il lupus eritematoso sistemico, mentre attenua malattie autoimmuni mediate da cellule infiammatorie (e quindi Th1), come la sclerosi multipla e l'artrite reumatoide. E' quindi possibile che la diversa reattività immunitaria condizionata dai diversi livelli di ormoni sessuali possa essere un fattore in grado di influenzare l'innescò e l'evoluzione della risposta autoimmune nei maschi e nelle femmine.

#### 1.4 Associazione con l'aplotipo HLA.

Il più noto fattore genetico di predisposizione alle malattie autoimmuni è l'aplotipo HLA. Infatti, per la maggior parte di queste malattie è stata descritta l'associazione con determinati alleli HLA. L'associazione è in genere con alleli di molecole MHC di classe II, anche se in alcuni casi è stata descritta l'associazione con molecole di classe I. Ad esempio, il rischio di sviluppo di diabete mellito insulino-dipendente è circa 20 volte maggiore in soggetti che esprimono HLA-DR3 e DR4, rispetto a soggetti che esprimono altri alleli; la probabilità di sviluppare sclerosi multipla è 5 volte maggiore nei portatori di DR2; quella di sviluppare miastenia grave è 5 volte maggiore nei portatori di DR3. L'associazione più stretta è però stata osservata nella spondilite anchilosante, il cui rischio di sviluppo è 90 volte superiore in soggetti portatori della molecola di classe I HLA-B27.

In molti casi è stato dimostrato che questa associazione può essere dovuta all'efficienza con cui le molecole predisponenti "presentano" i peptidi *self* responsabili della malattia autoimmune. E' intuitivo infatti che gli individui che esprimono molecole HLA capaci di presentare efficientemente i peptidi *self* verso cui si sviluppa una certa risposta autoimmune siano più



predisposti allo sviluppo della malattia rispetto a soggetti che esprimono molecole MHC poco efficienti nella presentazione degli stessi antigeni.

### 1.5 Autoimmunità e difetti genetici ereditari della funzione di Fas: la sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS).

Un fattore genetico ereditario che è stato più recentemente chiamato in causa nello sviluppo dell'autoimmunità è il difetto funzionale del sistema Fas/FasL. Il recettore Fas è una molecola regolatrice dell'apoptosi espresso dai linfociti attivati ed è coinvolto nello spegnimento della risposta immunitaria e nella eliminazione di gran parte dei linfociti effettori che si sono espansi nel corso della risposta.

In questo modo si evita che i linfociti si accumulino nell'organismo in conseguenza delle successive risposte immunitarie cui va incontro l'individuo nel corso della sua vita e si riduce il rischio che, una volta eliminato l'antigene, i linfociti attivati si indirizzino contro antigeni *self* che presentino somiglianze con gli antigeni non *self* eliminati. E' pertanto intuitivo che se questo sistema non funziona in modo corretto, si può verificare un accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari e un aumentato rischio di sviluppo di malattie autoimmuni.

### 1.6 Il modello dei topi *lpr* e *gld*.

La prima associazione tra autoimmunità e Fas è stata individuata sul modello dei topi *lpr* (lymphoproliferation) e *gld* (generalized lymphoproliferative disease), portatori di mutazioni recessive rispettivamente a carico del gene *apt-1* che codifica per il recettore Fas (cromosoma 19), e del gene che codifica per il suo ligando naturale, FasL (cromosoma 1) [2].

Topi omozigoti per la mutazione (*lpr/lpr* o *gld/gld*) sviluppano un quadro caratterizzato da:

- 1) linfadenopatia e/o splenomegalia,
- 2) autoimmunità con ipergammaglobulinemia, produzione di autoanticorpi, glomerulonefrite, artrite, vasculite

3) espansione non clonale periferica di linfociti T TCR  $\alpha\beta^+$  privi di CD4 e CD8 (propri dei T helper e dei T citotossici, rispettivamente) e per questo detti “doppi negativi” (DN). Essi sono bloccati allo stadio G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> del ciclo cellulare e probabilmente derivano da linfociti T maturi CD4+CD8- o CD4-CD8+.

Nei topi *lpr* sono state identificate due tipi di alterazioni genetiche: una impedisce 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 *lprcg*). I topi *gld* sono invece caratterizzati da una mutazione a livello della porzione extracitoplasmatica di FasL con conseguente alterazione del sito di legame con il suo recettore.

Il nesso causale tra l'alterata funzione del sistema Fas/FasL e la malattia è stato confermato dall'osservazione che topi *knock-out* per Fas sviluppano un quadro simile a quello dei topi *lpr* e *gld*; è possibile correggere il difetto nei topi *lpr* mediante l'espressione della forma *wild type* di Fas [3].

Le manifestazioni autoimmuni e l'iper-proliferazione linfocitaria di questi animali sono legate al difettoso spegnimento della risposta immunitaria da parte di Fas, che porta da un lato all'accumulo dei linfociti nel corso di attivazioni successive del sistema e dall'altro all'espansione di cloni autoimmuni.

### 1.7 La sindrome autoimmune/linfoproliferativa.

Nell'uomo è stata descritta una malattia simile a quella dei topi *lpr* o *gld* denominata sindrome autoimmune/linfoproliferativa (ALPS) [4-9]. La malattia si sviluppa in età pediatrica e, similmente ai topi *lpr* e *gld*, è caratterizzata da:

- 1) ridotta funzionalità del sistema Fas/FasL;
- 2) sviluppo di manifestazioni autoimmuni con associazioni variabili di anemia, trombocitopenia, neutropenia;
- 3) accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari, con linfadenopatia e/o splenomegalia;
- 4) espansione di linfociti T DN nel sangue periferico [4-6].

Come nel modello murino, anche nei pazienti con ALPS la funzionalità di Fas è ridotta a causa di mutazioni ereditarie deleterie che colpiscono geni coinvolti in questo sistema. Nei pazienti con ALPS di tipo Ia (ALPS-Ia) il difetto genetico è a carico del gene TNFRSF6 codificante Fas [10]; nei pazienti con ALPS-Ib è mutato il gene di FasL [11]; nei pazienti con ALPS-IIa e ALPS-IIb è mutato il gene codificante per caspasi-10 oppure quello per caspasi-8, coinvolte nella trasduzione del segnale di Fas; in altri pazienti Fas non funziona, ma il difetto genetico non è ancora stato identificato: si parla in questi casi di ALPS-III [12].

Sia nel topo che nell'uomo il quadro ALPS non sembra essere rigorosamente monogenico. Nel topo le mutazioni *lpr* e *gld* causano la malattia in omozigosi, ma la loro espressione dipende fortemente dal contesto genetico. Essa infatti è molto ridotta nei topi BALB/c rispetto ai topi MLR [13]. Altri fattori complementari sembrano quindi essere richiesti per lo sviluppo della malattia.

Anche nell'uomo la situazione sembra essere simile. Infatti nell'ALPS Ia la maggior parte dei pazienti è eterozigote per la mutazione di Fas, ma questo non sembra sufficiente per lo sviluppo della malattia in quanto il genitore portatore della mutazione è sempre sano.

La possibilità che questo "secondo fattore" necessario per lo sviluppo di ALPS abbia basi genetiche è suggerita dal fatto che spesso il secondo genitore (privo di mutazioni di Fas) presenta in genere anch'esso una ridotta funzionalità di Fas.

L'espressione della malattia quindi, potrebbe dipendere dal tipo e dalla gravità delle mutazioni e/o dalla co-presenza di più mutazioni o polimorfismi a carico della via di trasduzione del segnale apoptotico[14,15].

### 1.8 *La malattia autoimmune/linfoproliferativa di Dianzani (DALD), una variante di ALPS.*

Nel nostro laboratorio è stato identificato un gruppo di pazienti con un quadro clinico simile a quello degli ALPS con:

- 1) ridotta funzionalità di Fas;
- 2) autoimmunità prevalentemente ematologiche;

3) accumulo di linfociti negli organi linfatici secondari, con linfadenopatie e/o splenomegalia; ma privi della classica espansione di linfociti T DN nel sangue periferico, necessaria per la diagnosi di ALPS [16-18].

I caratteri clinici di questo gruppo di pazienti sono riassunti in **Tabella 1**.

I linfociti T dei soggetti studiati sono nella quasi totalità dei casi resistenti alla morte cellulare indotta da Fas, ma non presentano mutazioni a carico dei geni di Fas, FasL o caspasi-10. In aggiunta, i linfociti T della maggioranza di questi pazienti sono anche resistenti alla morte cellulare indotta da ceramide ed etoposide, che agiscono direttamente sul mitocondrio. La componente ereditaria della malattia è suggerita dal fatto che anche i genitori dei pazienti presentano una ridotta funzionalità di Fas (pur in assenza di malattia, come nell'ALPS). Inoltre, la fusione somatica dei linfociti T Fas-resistenti dei pazienti con una linea linfocitaria tumorale Fas-sensibile, determina la produzione di cellule ibride Fas-resistenti. Questi dati suggeriscono il coinvolgimento di mutazioni che colpiscono la via di Fas a valle del recettore e determinano la produzione di molecole che esercitano un'attività dominante negativa sulla funzione di Fas.

Questa forma di ALPS “incompleto” è stata denominata DALD (Dianzani's ALD) da McKusick sul sito OMIM del NIH (riferimento OMIM #605233; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>).

N° paziente	Sesso	età*	ANA	AM	HM	SM	AUTOIMMUNITA'
1	M	6	+	+	+	+	AHA, AN, T, RF
2	M	10	-	+	-	+	AN, E,
3	M	16	-	+	-	+	AN, T,
4	M	9	+	-	-	+	AHA, A
5	F	18	+	-	-	+	AN, RF
6	M	16	-	+	-	+	T, IH
7	F	24	+	-	+	+	AHA, IH
8	F	15	+	-	-	+	AHA, T, A1
9	M	16	+	-	+	+	AHA, T, IH
10	M	11	+	+	+	+	AHA, T, V
11	F	11	+	+	-	+	AHA,
12	F	17	+/-	-	-	+	AHA, T, E
13	M	15	-	+	-	-	T
14	M	5	+	+	-	+	T
15	M	10	+	+	+	+	AN, T, IH
16	M	33	n.d.	+	+	+	AN, T, A1
17	M	6	+	+	-	-	T
18	F	7	+	+	+	+	AHA, AN, T, E, A, C, SR, RF
19	M	10	+	+	-	+	IDDM, T, A1, AN
20	M	6	+	+	-	+	AN, T
21	M	13	-	+	-	+	AN
22	F	3	+	+	+	+	SR
23	M	17	+	+	+	+	AHA, AN, T, RF
24	F	9	+	-	-	+	T
25	M	2	+	+	-	+	AHA, IH, T
26	M	11	n.d.	+	+	+	AN, T

**Tabella 1. Dati clinici dei pazienti con DALD**

n.d. indica non determinato, ANA anticorpi antinucleo; AM, adenomegalia; HM, epatomegalia; SM, splenomegalia; A, artrite; A1, alopecia; AHA, anemia emolitica autoimmune; AN, neutropenia autoimmune; C, malattia celiaca; E, eczema; IDDM, diabete mellito insulino-dipendente; IH: epatite immune; T, trombocitopenia; V, vitiligine; SR, eruzioni cutanee; RF, febbre ricorrente.

\*: età nel periodo di studio (anni)

### *1.9 Coinvolgimento dei difetti funzionali di Fas nello sviluppo di malattie autoimmuni comuni.*

L'analisi delle famiglie dei pazienti con DALD ha evidenziato una aumentata incidenza di malattie autoimmuni comuni, quali lupus eritematoso sistemico, sclerosi multipla, diabete mellito di tipo 1 o artrite reumatoide in assenza di segni di "linfoproliferazione". Questa osservazione suggerisce che le alterazioni genetiche alla base della DALD possano anche favorire lo sviluppo di malattie autoimmuni comuni. Tale possibilità è stata poi confermata dall'osservazione che la ridotta funzionalità di Fas è presente anche in circa il 50% dei pazienti con sindrome autoimmune multipla (MAS) (ovvero appartenenti a famiglie con più di un caso di malattia autoimmune entro il secondo grado di parentela) e in sottogruppi di pazienti sporadici con diabete mellito di tipo 1, con sclerosi multipla o con autoimmunità tiroidee. In particolare il difetto era particolarmente frequente nei pazienti che presentavano quadri aggressivi di queste autoimmunità [19-21]

### *1.10 Altri sistemi coinvolti nello sviluppo di quadri autoimmuni/linfoproliferativi.*

Alcuni modelli murini evidenziano che quadri autoimmuni/linfoproliferativi possono anche non coinvolgere solo il sistema Fas/FasL; sono state infatti trovate alterazioni che coinvolgono altri sistemi recettoriali. Alcuni di questi difetti alterano sistemi di spegnimento della risposta immunitaria mediati da molecole diverse da Fas, come ad esempio PD-1 e CTLA-4. Altri difetti possono invece favorire la proliferazione linfocitaria piuttosto che diminuire l'apoptosi, mediante il coinvolgimento delle molecole BAFF e PTEN. Questi modelli murini suggeriscono che manifestazioni simili all'ALPS possono essere causate da alterazioni che coinvolgono non solo l'apoptosi, ma anche la proliferazione dei linfociti.

## 2. RUOLO DELL'APOPTOSI NEL SISTEMA IMMUNITARIO.

### 2.1 Maturazione dei linfociti negli organi linfatici primari (tolleranza centrale).

La morte cellulare programmata (MCP) svolge un ruolo fondamentale nello sviluppo, nella regolazione e nel corretto funzionamento del sistema immunitario [22]. Nel corso della loro maturazione, rispettivamente nel midollo osseo e nel timo, i precursori dei linfociti B e T inizialmente riarrangiano in modo casuale i geni per i rispettivi recettori per l'antigene (Ig per i linfociti B e TCR per i linfociti T) e successivamente subiscono un rigoroso processo di selezione clonale che porta alla morte per MCP dei linfociti che riconoscono antigeni *self* (*selezione negativa*). Grazie a questo processo, il "repertorio" di recettori per l'antigene che passa in periferia sarà costituito esclusivamente da recettori per antigeni non-*self*.

Nel timo, organo linfatico primario per i linfociti T, questo processo di selezione del "repertorio" periferico è complicato ulteriormente dal particolare meccanismo di riconoscimento dell'antigene proprio dei linfociti T. Questi infatti non riconoscono l'antigene (di regola una proteina) in forma nativa, ma solo dopo che esso è stato "processato" dalle cellule presentanti l'antigene (APC) ed esposto come peptide complessato ad una molecola MHC, un sistema molecolare poligenico e altamente polimorfico [23,24]. Il TCR riconosce poi il complesso tra un particolare peptide e una particolare variante di molecola MHC. Pertanto nel corso della maturazione timica occorre non solo che vengano eliminati i timociti potenzialmente autoreattivi, ma anche che venga consentita la maturazione solo dei timociti il cui TCR "si adatta" alle particolari molecole MHC espresse da quell'individuo (le molecole MHC *self*)

In effetti nella prima fase della selezione timica, definita di *selezione positiva*, viene consentita la sopravvivenza solo dei timociti i cui TCR si adattano alle molecole MHC espresse dalle cellule epiteliali timiche; tutti gli altri timociti non ricevono questo segnale di sopravvivenza e muoiono per MCP.

Durante una seconda fase si verifica il processo di *selezione negativa* (simile a quello che si verifica nel midollo osseo per i linfociti B), in cui si ha l'eliminazione per MCP (delezione clonale) dei timociti con TCR specifico per peptidi *self* associati alle molecole MHC *self*.

L'insieme di questi due processi porta ad un repertorio di linfociti T tollerante nei confronti del *self*.

## 2.2 Tolleranza periferica.

La delezione dei cloni linfocitari autoreattivi non si esaurisce nella selezione a livello degli organi linfatici centrali. Questo filtro, infatti, non riesce a riconoscere tutti i cloni autoreattivi poiché non tutti gli antigeni *self* sono rappresentati nel midollo osseo e nel timo. Fortunatamente, l'immissione in periferia di linfociti T potenzialmente autoreattivi non porta necessariamente allo sviluppo di malattie autoimmuni in quanto queste cellule possono ancora essere controllate da meccanismi di tolleranza periferica.

La corretta attivazione del linfocita, che porta alla sua proliferazione e differenziamento a linfocita effettore, richiede la concomitanza di due segnali: un primo segnale legato all'interazione del recettore per l'antigene con l'antigene e un secondo segnale legato all'interazione di una molecola co-stimolatoria del linfocita T col suo ligando espresso dalla APC. Nel caso del linfocita T la molecola co-stimolatoria è CD28, che interagisce con i ligandi CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) espressi dalle APC attivate.

Il riconoscimento dell'antigene in assenza del secondo segnale, porta all'inattivazione del linfocita mediante induzione di anergia o di MCP, definita in questo caso morte cellulare indotta da attivazione (AICD). Questo processo assicura che l'attivazione del linfocita sia controllata da un secondo tipo cellulare con un tipico sistema a "*double check*". In pratica, questo sistema fa sì che la risposta immunitaria specifica sia attivata esclusivamente in un contesto infiammatorio (ovvero di danno cellulare), il che riduce il rischio di aggressioni contro il *self*.



Il meccanismo dell'AICD può essere suddiviso in due fasi: una fase induttiva dovuta alla stimolazione del recettore per l'antigene, e una fase effettrice che porta alla morte cellulare. Poiché molecole quali actinomicina D o cicloesamide bloccano l'AICD, si ritiene che la fase induttiva determini la trascrizione di un nuovo set di geni coinvolti nella MCP.

Tra le due fasi descritte, intervengono molecole appartenenti alle famiglie del TNF e TNFR, la cui espressione e funzione dipende fortemente dalla stimolazione del TCR.

### *2.3 Attività citotossica cellulo-mediata.*

La MCP ha una importanza chiave nella citotossicità cellulo-mediata. I linfociti citotossici, infatti, si legano al bersaglio e lo uccidono innescando la MCP attraverso vari meccanismi [25,26].

1) Il linfocita citotossico degranula liberando perforina e granzimi nello spazio intercellulare che la separa dal bersaglio. Perforina è una molecola che ha un notevole grado di omologia col fattore C9 del complemento ed è capace di polimerizzare sulla membrana del bersaglio producendo dei pori. Attraverso i pori passano i granzimi, proteasi capaci di innescare l'apoptosi del bersaglio attivando la caspasi-10 e probabilmente anche altre caspasi.

2) I linfociti citotossici esprimono il FasL che si lega al Fas espresso dalla cellula bersaglio inducendo la sua MCP.

3) I linfociti citotossici producono  $TNF\alpha$  e/o linfotossina, che, interagendo con i rispettivi recettori, innescano la MCP del bersaglio.

L'uccisione attraverso la MCP offre il vantaggio di non disperdere il contenuto cellulare nel tessuto. Questo è particolarmente auspicabile nel caso di bersagli infettati da virus. Infatti, l'attivazione della MCP permette di frammentare gli acidi nucleici del virus e di "sterilizzare" la cellula dal virus prima della fagocitosi da parte del macrofago.

Il fatto che tutti questi meccanismi agiscano alla fine sul sistema delle caspasi ha indotto i virus a sviluppare meccanismi di immunoevasione basati sul blocco di questo sistema [27]. I virus possono produrre molecole come le FLIP e le IAP che bloccano, rispettivamente, fasi precoci e tardive della cascata caspasi.

#### 2.4 *Spegnimento della risposta immunitaria.*

L'apoptosi svolge anche un importante ruolo nello spegnimento della risposta immunitaria al fine di riportare in condizioni fisiologiche la popolazione di linfociti espansi nel corso della risposta immunitaria stessa.

Questo sistema di controllo è importante in due processi: 1) impedisce che vi sia un progressivo accumulo di cloni linfocitari negli organi linfatici secondari nel corso delle successive risposte immunitarie; 2) impedisce che questo accumulo di linfociti funzioni da fattore promuovente lo sviluppo di reazioni autoimmuni o di neoplasie linfocitarie.

L'apoptosi dei linfociti attivati nel corso della risposta immunitaria coinvolge due sistemi, uno "passivo" e uno "attivo".

1) Il sistema passivo è legato al venir meno degli stimoli trofici assicurati dalla risposta immunitaria. L'esaurimento dell'antigene, infatti, determina una riduzione della produzione 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 anti-apoptotiche e il conseguente innesco di MCP (morte per "*cytokine withdrawal*").

2) Il sistema attivo è invece indipendente dall'esaurimento dell'antigene ed è legato a un "orologio biologico" del linfocita effettore, che ne causa la morte dopo alcuni giorni dalla sua attivazione. Questa morte è favorita da una riattivazione del linfocita da parte dell'antigene (si parla allora di AICD) ed è legata all'azione di opportuni "recettori di morte" appartenenti alla famiglia del TNF receptor (TNFR). Questa MCP attiva ha lo scopo di controllare il rischio che la

risposta immunitaria, dopo l'eliminazione dell'antigene, si indirizzi erroneamente contro molecole *self* simili alle molecole esogene bersaglio della risposta.

Le citochine esercitano un ruolo fondamentale in entrambi i tipi di spegnimento della risposta immunitaria ora descritti [28]. Infatti la forma passiva può essere impedita da citochine di crescita come IL-2, IL-4, IL-7 e IL-15. Viceversa la forma attiva è favorita dalla IL-2, la cui presenza ad alte concentrazioni sensibilizza l'attività dei recettori pro-apoptotici riducendo l'espressione cellulare di inibitori dell'apoptosi, come FLIP o Bcl-2 (vedere le sezioni successive).

La forma attiva e passiva dell'apoptosi presentano importanti differenze molecolari. L'apoptosi passiva richiede la sintesi di nuove proteine, coinvolge prevalentemente il mitocondrio ed è fortemente inibita da molecole della famiglia di Bcl-2 e da molecole correlate. Viceversa l'apoptosi attiva è indipendente dalla sintesi di nuove proteine ed è innescata dalla stimolazione di recettori di morte sulla superficie cellulare. Il sistema recettoriale più studiato per lo spegnimento della risposta immunitaria è, appunto, il sistema Fas/FasL.

### 3. I RECETTORI DI MORTE

#### 3.1 Il sistema Fas/FasL.

Fas (CD95/Apo-1) è una glicoproteina transmembrana di 45-48 kD di tipo I [29,30]. Esso è un recettore espresso dalla maggior parte dei tessuti e in modo particolare nei linfociti attivati.

Appartiene alla superfamiglia dei TNFR (*tumor necrosis factor receptor*), che comprende più di venti membri tra cui recettori di morte e recettori di crescita [31]. Una classificazione di questa famiglia individua una sottofamiglia di TNFR deputati alla trasmissione di segnali apoptotici e per questo definiti recettori di morte (*death receptors*) [32]. I *death receptors* includono, oltre a Fas, il TNFR1, il TNFR2, il recettore per la linfotossina (LT), quello per il nerve growth factor (NGF), le molecole CD30, CD27, CD40, 4.1BB e i recettori di TRAIL (*TNF-related- apoptosis-inducing-ligand*) [33].

Tutti i *death receptors* presentano caratteristiche strutturali comuni. Essi comprendono una porzione intra-citoplasmatica, definita *death domain*, necessaria per la trasmissione del segnale di morte. La regione extra-cellulare presenta una regione conservata tra tutti i membri della famiglia con tre domini ricchi di residui di cisteina (cysteine-rich domains CRD1, 2 e 3), oltre ad un dominio, detto PLAD (pre-ligand assembly domain) localizzato nella porzione amino-terminale della molecola ed importante per il legame con il ligando, ma distinto dal sito di effettivo legame [34]. PLAD esplica la sua funzione nel favorire la trimerizzazione del recettore, evento scatenato dal legame con il ligando, che si presenta, a sua volta, in forma trimerica.

Il sistema Fas/FasL è il sistema molecolare meglio caratterizzato nello spegnimento della risposta immunitaria, svolgendo, in realtà, due ruoli fondamentali [35]. Da un lato rappresenta uno dei meccanismi attraverso cui i linfociti con capacità citotossiche uccidono il bersaglio: essi esprimono infatti alti livelli di FasL (CD95L) che, interagendo con Fas presente sulla superficie delle cellule bersaglio, ne innesca la morte cellulare programmata. Dall'altro lato i linfociti

attivati esprimono elevati livelli di Fas e sono sottoposti alla regolazione negativa da parte di linfociti o altri tipi cellulari che presentano FasL. E' stato osservato che FasL è espresso costitutivamente ad elevati livelli in alcuni tessuti considerati "immunologicamente privilegiati", come occhio e testicolo, perché sono in grado di escludere le cellule immunitarie avvalendosi degli elevati livelli di FasL [36].

### 3.2 Il segnale apoptotico: le caspasi.

Le caspasi sono una famiglia di cisteino-proteasi fondamentali nel processo apoptotico mediato da Fas [37]. Esse presentano caratteristiche comuni: sono in grado di idrolizzare specifiche proteine bersaglio in corrispondenza di una sequenza consenso contenente acido aspartico (Asp-X-X-Asp) e hanno un sito attivo ricco di residui di cisteina. Le caspasi sono coinvolte in diversi aspetti della morte cellulare: alcune idrolizzano i precursori di citochine al fine di attivarli (caspasi-1 e -11), altre innescano la propagazione dei segnali apoptotici (caspasi iniziatrici -8, -9, -10), altre ancora realizzano il programma apoptotico mediante scissione diretta di diverse proteine vitali per la cellula e mediante l'attivazione di processi trascrizionali all'interno del nucleo (caspasi esecutrici -3, -6 e -7).

La famiglia delle caspasi coinvolte nella trasduzione del segnale mediata da Fas/FasL può essere suddivisa in due sottogruppi sulla base della specificità di substrato su cui agiscono: vengono dette *caspasi iniziatrici* le proteasi che agiscono nelle prime fasi del processo, quando le reazioni sono ancora reversibili, ed *esecutrici* le caspasi responsabili della fase effettrice del processo [38].

Tutte le caspasi sono prodotte sotto forma di pro-enzimi inattivi, che vengono attivati mediante l'eliminazione proteolitica della subunità inibitoria: l'attivazione è autocatalitica o mediata da un'altra caspasi.

Recenti osservazioni suggeriscono che le caspasi possano avere un ruolo anche nel controllo del ciclo cellulare. Sembra infatti che queste proteasi costituiscano punti di controllo addizionali

nel corso del ciclo cellulare: esse sarebbero necessarie sia per la rimozione proteolitica del “blocco per l’ingresso in mitosi”, sia per l’attivazione di altre proteine di induzione del ciclo [39].

### *3.3 La cascata di trasduzione del segnale apoptotico.*

L’interazione di Fas, assemblato in forma trimERICA, con un trimero di FasL innesca una cascata di eventi molecolari che portano alla morte apoptotica della cellula [40]. L’associazione tra Fas, la molecola adattatrice FADD (Fas-associated death domain) e le procaspasi-8 e -10 porta alla formazione del complesso DISC (death-inducing signaling complex) [41-47], complesso indispensabile per la loro attivazione.

L’attivazione della caspasi-8, -10 innesca una cascata proteolitica attivatoria che coinvolge le caspasi “esecutrici” -3, -7, -6, le quali intervengono in varia misura sui diversi aspetti della morte cellulare programmata.

Le caspasi partecipano anche ad una seconda via di segnalazione che passa attraverso il mitocondrio mediante due meccanismi distinti: la scissione proteolitica di Bid da parte di caspasi-8, e l’attivazione di sfingomielinasi acide e neutre che inducono la sintesi di ceramide [48].

Bid e ceramide determinano la depolarizzazione della membrana mitocondriale con rilascio di citocromo-*c* il quale, legandosi alla molecola adattatrice APAF-1 (apoptosis protease activating factor-1) e alla procaspasi-9, porta alla formazione di un complesso eptamerico detto apoptosoma che provoca l’attivazione della caspasi-9 [48-52].

Studi condotti su linee cellulari diverse hanno dimostrato come le cellule possano attivare il processo apoptotico mediato da Fas attraverso due vie, che consentono di distinguere le cellule in tipo I e tipo II [53].

Le cellule di tipo I intraprendono preferenzialmente la via diretta che da Fas porta all'attivazione delle caspasi, senza passare dal mitocondrio. In esse si verifica formazione del DISC con intensa attivazione della caspasi-8 e -10, seguita dall'attivazione della caspasi-3.

Al contrario, le cellule di tipo II prevedono il coinvolgimento precoce del mitocondrio, mentre la formazione del DISC e l'attivazione di caspasi-8 è fortemente ridotta.

#### 4. GLI INIBITORI DEL SEGNALE APOPTOTICO

L'intera via di trasduzione del segnale è sotto il controllo di tre grandi famiglie di molecole inibitorie: la famiglia di cFLIP, la famiglia di Bcl-2 e quella delle IAP.

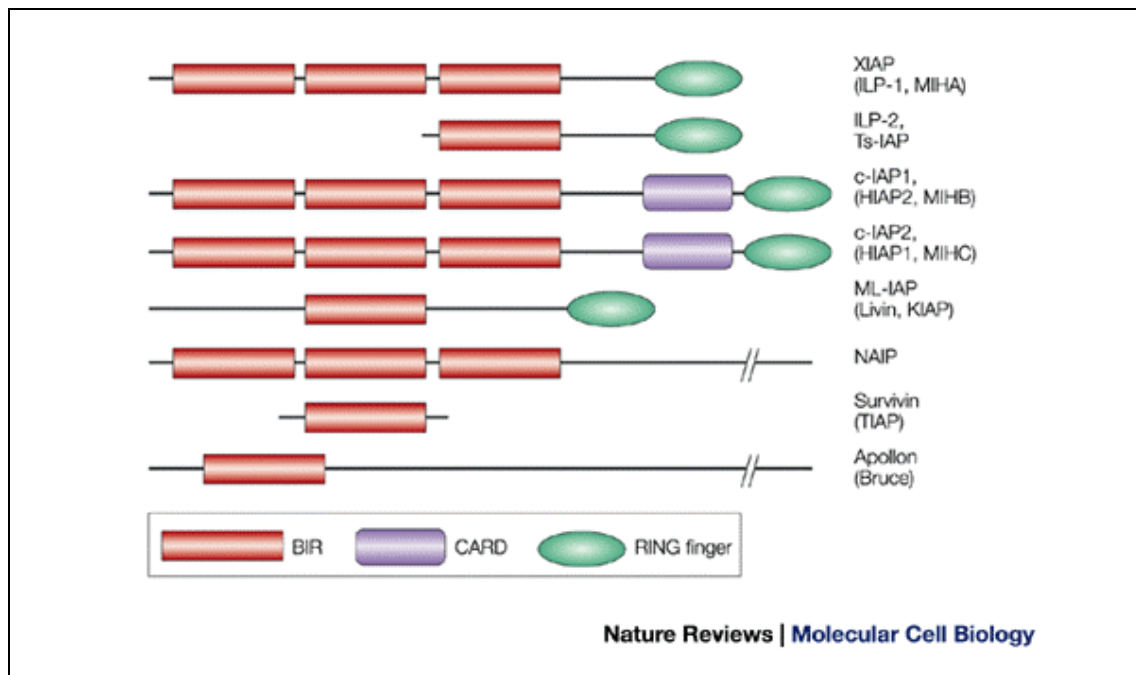
cFLIP ha una struttura molecolare che lo rende altamente omologo alla caspasi-8, ma è privo di attività enzimatica. Esso è quindi in grado di associarsi al complesso Fas/FADD formando una struttura simile al DISC, ma inattiva; in questo modo impedisce l'attacco della caspasi-8 competendo con essa nel legame con FADD.

La famiglia di Bcl-2 comprende due classi funzionali di molecole: quelle ad azione anti-apoptotica (Bcl-2 e Bcl-XL) e quelle ad azione pro-apoptotica (Bax, Bcl-XS, BAK, BAD) [54-56]. I vari membri di questa famiglia possono formare omodimeri (es. Bcl2/Bcl2) oppure eterodimeri, interagendo con altre molecole della stessa famiglia (es. Bcl2/Bax); tale fenomeno ha la capacità di regolare l'attività pro- o anti- apoptotica di queste molecole [57], influenzando sulla via mitocondriale dell'apoptosi e modulando il rilascio del citocromo-*c*.

La famiglia delle IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (**Figura 1**) comprende una serie di proteine (c-IAP1, c-IAP-2, la forma ubiquitaria XIAP, la forma neuronale N-IAP, survivina), che agiscono inattivando le caspasi, mediante un meccanismo di associazione/sequestro [58-61]. Le proteine che appartengono alla famiglia delle IAP sono considerate multifunzionali per la capacità di inattivare sia caspasi iniziatrici sia esecutrici; tale multifunzionalità si riflette nella struttura modulare delle singole molecole. Esse, infatti, sono costituite da regioni conservate specifiche: in corrispondenza dell'estremità amino-terminale sono localizzati i cosiddetti domini BIR (Baculoviral IAP Repeat), in numero variabile compreso tra 1 e 3, responsabili del legame con le caspasi; l'estremità carbossi-terminale è costituita dal dominio detto RING finger (Really Interesting New Gene), coinvolto nell'ubiquitinazione delle proteine, mentre un dominio CARD (Caspase Recruitment Domain) è tipico delle sole molecole c-IAP1 e c-IAP2 [62]. Survivina è



una proteina a struttura unica implicata nella citoprotezione durante il fenomeno apoptotico: essa forma con XIAP un complesso IAP-IAP promuovendone la stabilità e incrementando l'attività inibitoria nei confronti di caspasi 9 [63].



**Figura 1.** Struttura modulare della famiglia delle IAP.

#### 4.1. XIAP: Struttura e funzione.

Tra le molecole, appartenenti alla famiglia delle IAP, la più studiata è XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein); la proteina, costituita da 497 amminoacidi e con un peso molecolare di circa 56 kD, è codificata da un gene costituito da 7 esoni localizzato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq25)[64].

Un modo analogo di definire XIAP è BIRC4 (Baculoviral IAP Repeat Containing 4), poiché la proteina è stata descritta per la prima volta in una particolare specie virale. Nei Baculovirus infatti tale molecola agisce bloccando l'apoptosi, innescata dalle cellule, come meccanismo di difesa, nei confronti dell'infezione virale. XIAP è ubiquitariamente espresso in tutti i tessuti normali [65-67].

XIAP contiene due tipi di sequenze conservate: i BIR, localizzati nella porzione amino-terminale della molecola, e il RING nella regione carbossi-terminale..

Recenti studi genetici mostrano come i tre domini BIR di XIAP siano essenziali per le funzioni inibitorie che la proteina esercita sia sulla caspasi-9 (iniziatrice), sia su quelle esecutrici -3 e -7 [68,69].

Studi recenti hanno inoltre determinato la struttura cristallografica di XIAP e hanno rivelato nei dettagli le strutture molecolari necessarie per le interazioni con le caspasi -3, -7 e -9. XIAP può essere *clivato* dalle caspasi [68], fenomeno che viene riscontrato nei linfociti T che vanno incontro ad apoptosi [70].

La regione *linker* tra il dominio BIR1 e il BIR2 è importante per il legame con caspasi -3 e -7 [71-73]. Gli amminoacidi della regione linker che precede il BIR2 legano il sito attivo di caspasi -3 e -7 con una orientazione anti-parallela inibendo l'attività enzimatica di queste caspasi [72-74].

Il meccanismo di inattivazione della caspasi-9 risulta essere fondamentalmente differente da quello che coinvolge le caspasi esecutrici. Esiste infatti una tasca idrofobica nel BIR3 di XIAP che viene occupata dai primi quattro amminoacidi della caspasi-9 attiva (subunità p12), in particolare il residuo W310 nel BIR3 risulta essere critico per il legame [75-78]. XIAP è l'unica IAP in grado di bloccare la caspasi-9 proprio perché contiene il BIR3 responsabile del legame [75,79].

La funzione del primo dominio BIR di XIAP è ancora sconosciuta e non esistono dati per dimostrare che tale regione possa bloccare l'azione delle caspasi; infatti, la proteina tronca, contenente solo il dominio BIR1, non è in grado di interagire con le caspasi esecutrici e, di conseguenza, non può inattivare il sistema Fas che porta all'apoptosi. Un'ipotesi attribuisce a BIR1 un'azione di stabilizzazione dell'intera proteina.

Per quanto riguarda il dominio RING esso conferisce alla proteina attività E3-ligasica ed è indispensabile per promuovere la propria auto-degradazione [80] e la degradazione via

proteasoma di molecole bersaglio quali caspasi -3, caspasi-9 e la molecola modulatrice Smac/DIABLO.

L'attività anti-apoptotica di XIAP può essere soppressa da due proteine mitocondriali Smac/DIABLO e Omi/HtrA2 [81-86]. Queste molecole vengono rilasciate dal mitocondrio nel citoplasma durante l'apoptosi e si legano a XIAP a livello della tasca idrofobica presente sul BIR3, la stessa alla quale si lega caspasi-9, poiché la sequenza tetrapeptidica nella porzione ammino terminale di queste molecole è molto simile a quella della sub-unità p12. Ciò rende il legame di queste tre molecole con XIAP mutualmente esclusivo [74,75,87,88].

Oltre al ruolo di inibitore della caspasi, XIAP interviene in altre vie di trasduzione del segnale della cellula. E' stato dimostrato come l'espressione ectopica di XIAP attivi la via di JNK (N-terminal c-Jun Kinase) [89,90] esercitando un effetto protettivo nei confronti della cellula, probabilmente come risultato dell'interazione di XIAP con TAB1 [91] e ILPIP [92] che attivano la MAP3-kinasi TAK1. Altri studi hanno cercato di spiegare l'azione di XIAP nella via di NF-kB (transcription factor nuclear factor-kB). L'attivazione di NF-kB nelle cellule endoteliali avviene per attivazione della Ikb kinasi da parte di TAK1 [93-95].

Lewis et al. hanno dimostrato che le proprietà di XIAP come inibitore delle caspasi o come molecola che interviene nel *signaling* sono ben distinte e indipendenti l'una dall'altra [96].

I livelli cellulari di XIAP appaiono ben regolati a livello post-trascrizionale e la traduzione di Xiap viene regolata in seguito a stress fisiologico [97].

#### 4.2. *Il modello murino.*

Nel tentativo di comprendere la funzione di XIAP nelle cellule normali sono stati generati topi in cui il gene è stato inattivato (*Xiap*<sup>-/-</sup>). Topi *knock-out* per XIAP sono nati con la frequenza mendeliana attesa senza evidenti difetti fisici e l'analisi istologica su tessuti selezionati (cuore, fegato, rene, polmone e cervello) non ha evidenziato alcuna differenza rispetto ai topi *wild type*; inoltre, non è stata osservata alcuna variazione nell'apoptosi mediata da Fas. Da un punto di vista biochimico le cellule murine, private del gene per XIAP, presentano incrementati livelli di c-IAP1 e c-IAP2; questo dato suggerisce che esista un meccanismo in grado di compensare l'espressione degli altri membri della famiglia, quando quella di XIAP è deficitaria [98].

## **5. SCOPO DELLA TESI.**

Lo scopo di questa tesi è quello di ricercare e caratterizzare mutazioni a carico di molecole coinvolte nella trasduzione e nella regolazione del segnale apoptotico, che possono essere coinvolte nello sviluppo o nel decorso delle malattie autoimmuni.

In particolare verrà analizzato come la mancata funzionalità del sistema Fas/FasL correli con lo sviluppo e il decorso del Diabete Mellito di tipo I; come l'aumentata espressione della molecola inibitoria XIAP correli con lo sviluppo delle sindromi da febbre periodica (definite anche malattie auto-infiammatorie); e come alterazioni della stessa molecola inibitoria possano essere concausa dello sviluppo della sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS).

## 6. DIABETE MELLITO DI TIPO I.

### 6.1 *Eziologia e patogenesi.*

Il diabete mellito di tipo 1 (T1DM) rappresenta una delle più gravi forme cliniche di diabete mellito, in cui la distruzione delle cellule  $\beta$  del pancreas comporta generalmente l'incapacità di produrre insulina [99-102]. A tutt'oggi il T1DM viene distinto in due forme: diabete mellito di tipo 1A (o immunomediato), che origina a seguito della distruzione delle cellule  $\beta$  e che può essere a insorgenza rapida (giovanile) o ad esordio lento (Latent Autoimmune Diabetes-LADA, in soggetti adulti) [100-102] e di tipo 1B (o idiopatico), meno frequente, le cui cause non sono ancora note e presente soprattutto in individui con discendenti asiatici o africani [103].

L'eziologia della malattia resta ancora in gran parte sconosciuta, anche se è ampiamente accettato che l'origine del disturbo sia multifattoriale, particolarmente legata ad un'interazione tra predisposizione genetica da una parte e fattori ambientali dall'altra [104–106]. La suscettibilità genetica è stata ampiamente dimostrata per particolari combinazioni genetiche degli antigeni HLA: nello specifico sono stati identificati aplotipi predisponenti la malattia (DQA1\*0301-DQB1\*0302 e DQA1\*0501-DQB1\*0201) e protettivi (DQA1\*0102-DQB1\*0602). Altri geni associati sia a rare sindromi, come i geni AIRE e Foxp3, che a condizioni di autoimmunità, ad esempio PTPN22 e CTLA-4, sembrano svolgere un ruolo nella patogenesi del T1DM [107].

I fattori ambientali coinvolti nell'innesco della risposta autoimmune, che danno inizio alla distruzione delle cellule  $\beta$ , comprendono: virus (enterovirus, rosolia congenita, coxsackie virus) [109, 110], tossine (nitrosamine) [111] e alimenti (proteine del latte, cereali, glutine) [112–116].

L'eccessiva attivazione del sistema immunitario mediato da linfociti T in soggetti predisposti, porta ad una risposta infiammatoria all'interno delle insule pancreatiche (insuliti) e

ad una risposta umorale (mediata dai linfociti B) che conduce alla produzione di anticorpi diretti contro antigeni pancreatici. Sono stati individuati numerosi anticorpi rivolti verso le varie strutture delle isole pancreatiche, attualmente entrati anche nell'uso diagnostico: **ICA** (Islet Cell Autoantibodies) [117] rivolti ad antigeni bersaglio dell'insula estremamente eterogenei; sono presenti nella maggioranza dei casi di diabete 1A già in fase pre-diabetica, nel 70% dei casi all'insorgenza della malattia, nel 50% dopo sei mesi, nel 35% dopo due anni e nel 15% oltre i due anni; **GADA** (Glutamic Acid Decarboxylases Autoantibodies) [118] sono rivolti contro la Glutammato Decarbossilasi (GAD) da 65 kDa prevalentemente; sono presenti in circa il 60% dei casi di diabete di tipo 1A, sono caratterizzati da prolungata persistenza dopo l'esordio della malattia e sono quindi determinanti nella diagnosi del LADA; **IA-2** (IA-2A Autoantibodies) sono rivolti contro una tirosin-fosfatasi che interviene nel trasporto dei segnali dal citoplasma alle vescicole secretorie delle cellule. Sono presenti in circa il 40% dei casi e caratterizzano il rapido evolvere della malattia verso l'insulina-dipendenza e sono più frequenti nei giovani; **IAA** (Insulin Autoantibodies) [119] rivolti contro l'insulina nativa: sono un marcatore precoce di autoimmunità, nella prima infanzia sono i più frequentemente trovati (presenti in > 90% dei casi) e spesso in tale età la loro comparsa precede quella degli ICA, dei GADA e degli IA-2; sono caratterizzati da rapida scomparsa.

Un'evidenza che supporta la patogenesi autoimmune del T1DM deriva dalla suscettibilità dei pazienti a sviluppare altre condizioni autoimmuni quali la tiroidite di Hashimoto, la malattia di Graves, la malattia di Addison, il morbo celiaco, e la miastenia grave [120–123].

L'associazione tra una risposta iper-attiva del sistema immunitario e il T1DM è dimostrato nei topi NOD (Non-Obese Diabetic), modello animale più comunemente studiato di diabete spontaneo, nei quali l'eliminazione dei linfociti T impedisce lo sviluppo di T1DM; inoltre il trasferimento di cellule T da un donatore malato ad un ricevente sano si associa all'induzione della malattia [124].

Il mimetismo molecolare associato ad infezioni rappresenta una delle ipotesi per spiegare l'autoimmunità nel T1DM, tuttavia è evidente che il precoce rimodellamento e /o omeostasi che si assiste nella massa delle cellule  $\beta$  coinvolge il meccanismo apoptotico all'interno delle cellule stesse [125] che può innescare a sua volta l'autoimmunità.

Anche se la relazione tra apoptosi delle cellule  $\beta$  e autoimmunità rimane ancora da stabilire in modo completo, esistono evidenze per cui l'apoptosi mediata dalle cellule T rappresenta un meccanismo dominante nel T1DM [124].

Sia i linfociti T-Helper ( $CD4^+$ ) che i T-Citotossici ( $CD8^+$ ) rappresentano importanti effettori finali nella distruzione delle cellule  $\beta$  [126–128], ma anche i macrofagi e le cellule dendritiche giocano un ruolo importante, non solo come cellule presentanti l'antigene, ma anche come fonte di radicali dell'ossigeno o di altri mediatori citotossici solubili [129].

Tuttavia, mentre sono note le cellule effettrici ed il loro ruolo nello sviluppo della malattia, ancora molto discusso rimane il meccanismo fisiologico e quali siano quindi le molecole coinvolte nella morte delle cellule  $\beta$ .

Perforina, Fas e il suo ligando (FasL), il fattore di necrosi tumorale ( $TNF\alpha$ ), l'interleuchina 1 (IL-1), l'interferone gamma ( $INF\gamma$ ), i radicali liberi dell'ossigeno (NO) sono tutte molecole coinvolte nell'apoptosi cellulare, anche se non è ancora nota quale sia tra queste la molecola che svolge il ruolo cruciale nella fase finale di sviluppo della malattia [130].

## 6.2 *T1DM e sistema Fas/FasL.*

E' stato dimostrato che difetti ereditari della funzionalità del sistema Fas/FasL sono coinvolti nello sviluppo di malattie autoimmuni comuni quali il T1DM, la sclerosi multipla (MS), le polineuropatie croniche infiammatorie demielinizzanti (CIDP) e la tiroidite autoimmune [131-136]. Inoltre il difetto di tale processo apoptotico sembra influenzare non solo lo sviluppo ma soprattutto con il decorso delle malattie stesse. Nella sclerosi multipla e nelle CIDP, le



alterazioni a carico del sistema Fas/FasL risultano più frequentemente correlate con le forme progressive piuttosto che con le forme recidivanti-remittenti [133, 136]. Nella tiroidite di Hashimoto il difetto di Fas è molto più frequente in quei pazienti che iniziano più precocemente la terapia sostitutiva, sintomo di un attacco immunologico più aggressivo.

Nel T1DM solo il 20% dei pazienti manifesta ridotta funzionalità di Fas (definiti Fas-Resistenti o Fas-R). Tale percentuale che cresce fino al 70% in quei pazienti il cui quadro clinico è composto da T1DM in associazione con una seconda malattia autoimmune (T1DM polireattivi o T1DM-p) [134, 137,138]. L'osservazione che anche i genitori dei pazienti Fas-R, manifestano difetti a carico del sistema Fas/FasL, suggerisce che, al pari dell'ALPS, anche nel T1DM esista una componente ereditaria.

Non essendo state trovate mutazioni a carico dei geni codificanti per Fas, FasL e caspasi-10 nei pazienti T1DM è possibile ipotizzare che il difetto funzionale colpisca le molecole a valle del recettore, e coinvolte nella traduzione del segnale apoptotico [134].

Per individuare un possibile difetto nella traduzione del segnale Fas mediato, il nostro gruppo ha precedentemente analizzato l'attivazione della caspasi-8 e -9, marcatori rispettivamente dell'attivazione della via estrinseca ed intrinseca del segnale apoptotico, in pazienti Fas-R con tiroidite autoimmune. Questo studio ci ha permesso di chiarire che nei pazienti con tiroidite di Hashimoto, il difetto di apoptosi si associava ad una mancata attivazione di entrambe le caspasi, suggerendo quindi un difetto molto precoce nella via di trasduzione del segnale apoptotico. Tuttavia in pazienti con il morbo di Graves l'attivazione delle caspasi non mostrava nessun tipo di alterazione, suggerendo in questo caso una alterazione molto più tardiva del segnale apoptotico.

### 6.3 *Scopo del lavoro.*

Visto il difetto apoptotico riscontrabile in pazienti affetti da T1DM e T1DM-p, e in considerazione del fatto che la seconda malattia autoimmune era frequentemente la tiroidite di Hashimoto, lo scopo di questo lavoro era di analizzare la via intrinseca ed estrinseca dell'apoptosi Fas-mediata in pazienti Fas-R affetti da T1DM e T1DM-p. Questo studio si proponeva l'obiettivo di chiarire quale potesse essere il quadro della disfunzione e poterla correlare con il decorso della malattia.

### 6.4 *Materiali e Metodi.*

#### *Pazienti.*

Per lo studio sono stati reclutati 71 pazienti affetti da T1DM, sia in età adulta sia in età pediatrica, (età media 12.9, range 4-32) provenienti dall'Ospedale maggiore della Carità di Novara (n=21), dall'Ospedale Regina Margherita di Torino (n=49) e dall'Ospedale Brotzu di Cagliari (n=8). Cinquanta di questi erano affetti solo da T1DM, gli altri 28 da T1DM polireattivo, suddivisi fra 21 con Tiroidite di Hashimoto (HT), 4 con morbo celiaco (MC) e 3 con sclerosi multipla (MS). Le caratteristiche cliniche sono descritte nella **Tabella 2 e 3**. La diagnosi di HT è stata posta per la presenza di autoanticorpi diretti contro tireoglobulina o tireoperossidasi e caratteristiche ultrasonografiche di tiroidite (grado Sostre 2-3). Dodici di questi erano in trattamento con L-tiroxina con conseguenza di bassi livelli di tiroxina libera (FT4) (<0.80 ng/dl; valore normale 0.80-1.90) o di alti livelli di TSH (>8UI/ml; valore normale 0.4-4), mentre gli altri nove mostravano livelli normali di FT4 e TSH. Tutti i pazienti con MC erano in dieta priva da glutine. Sono stati esclusi dall'analisi i pazienti affetti da sindrome di Down o Turner. I soggetti di controllo inclusi in questo studio sono stati selezionati per avere pari età ed essere privi di sintomatologie autoimmuni o allergiche, oltre ad avere una funzionalità di Fas simnella norma. Tutti i soggetti e i parenti dei minori hanno approvato lo studio con consenso informato.

### *Analisi funzionale del sistema Fas.*

L'apoptosi Fas-indotta è stata valutata su linfociti T ottenuti da cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) attivate con fitoemoagglutinina (PHA) al giorno T0 (1 µg/ml) e al giorno T12 (0,1 µg/ml) e coltivate in terreno RPMI 1640 completato con 10% di siero fetale bovino (FBS) e interleuchina-2 (IL-2) (2U/ml). La funzionalità del sistema Fas è stata valutata sei giorni dopo la seconda stimolazione (T18) incubando le cellule con terreno contenente o no (terreno di controllo) l'anticorpo monoclonale agonista anti-Fas clone CH11 (1µg/ml) , in presenza di Il-2 (1U/ml) per minimizzare la morte spontanea. La percentuale di sopravvivenza cellulare è stata valutata 18 ore dopo lo stimolo tramite test di esclusione con Blu Tripano. Ciascun paziente è stato analizzato con soggetti di controllo sani al momento del test. I risultati sono espressi come percentuale di sopravvivenza calcolato come: (totale delle cellule vive nel pozzetto del test/ totale delle cellule vive nel pozzetto di controllo) x 100. Tutti i pazienti con un valore di sopravvivenza superiore o uguale a 82% (pari al 95° percentile calcolato sulla popolazione di controllo) sono stati considerati Fas-resistenti (FasR). I soggetti con percentuale di sopravvivenza inferiore a tale valore sono definiti Fas-sensibili (FasS).

### *Saggio di attività caspasi ed espressione.*

Il saggio di attivazione delle caspasi-8 e -9 è stato condotto su linfociti T ottenuti da PBMC derivati da pazienti FasR attivati con PHA al giorno T0 (1 µg/ml) e al giorno T8 (0,1 µg/ml) e coltivate in terreno RPMI 1640 completato con 10% di siero fetale bovino (FBS) e interleuchina-2 (IL-2) (10U/ml). Quattro giorni dopo la seconda stimolazione le cellule sono state incubate o no con anticorpo CH11 (2µg/ml) in ghiaccio per 30 minuti, quindi trasferite a 37°C per 3 ore. Allo scadere dell'incubazione le cellule sono state centrifugate e lisate, quindi l'estratto proteico è stato quantizzato tramite Biorad Protein Assay. Per ciascun test sono stati utilizzati 50µg di

lisato totale, analizzati in doppio, corsi in parallelo con altrettanto campione derivato da soggetti di controllo FasS. I risultati sono stati espressi come attività caspasi relativa, ovvero: (attività della caspasi su cellule stimulate/ attività della caspasi su cellule non stimulate) x 100.

Il grado di espressione delle caspasi è stato valutato tramite SDS-page e immunoblotting utilizzando 100 µg di lisato cellulare. Le membrane di nitrocellulosa sono state bloccate con TBS contenente 5% latte in polvere e 0,1% Tween-20, incubate per 16 ore con gli anticorpi diretti verso la caspasi-8 e la caspasi-9, quindi rilevati con anticorpo secondario coniugato con perossidasi e analizzati in chemiluminescenza. Le bande ottenute sulle lastre sono state quantizzate con il GelDoc EQ system.

#### *Analisi statistiche.*

Tutti i dati sono stati analizzati con il test non parametrico Mann-Whitney U oppure con il test Fisher. I dati relativi alla funzionalità di Fas e della sua via di segnalazione sono espressi come maggiore del 95° percentile per funzionalità di Fas oppure inferiore del 5° percentile per l'attività caspasi, calcolati entrambi sulla popolazione di controllo.

## 6.5 *Risultati.*

### *Distribuzione dei soggetti FasR.*

L'apoptosi Fas-indotta è stata valutata in linfociti T derivati da 50 pazienti con T1DM e 28 con T1DM-p per determinare la porzione di pazienti resistenti allo stimolo.

Abbiamo individuato che 14 pazienti T1DM su 50 (38%) e 21 pazienti T1DM-p su 28 (pari al 75%) mostrano il fenotipo FasR (**Tabella 2**). Conducendo su questi dati un test di Fisher abbiamo verificato che la frequenza di soggetti FasR era significativamente più alta in entrambe le popolazioni di pazienti analizzate, se confrontate a quella di controllo (7 FasR su 150 soggetti di controllo, pari al 5%) con una significatività pari a  $p < 0.001$ . Valutando la proporzione di pazienti FasR nei due quadri clinici si è potuto anche notare che i pazienti FasR erano significativamente più numerosi nel gruppo T1DM-p, con un  $p < 0.001$ . Stratificando i pazienti T1DM-p sulla base della seconda malattia autoimmune, abbiamo, potuto riscontrare la stessa proporzione di soggetti FasR indipendentemente che la seconda malattia fosse la tiroidite di Hashimoto (15/21, 71%) o una seconda manifestazione autoimmune che non fosse la tiroidite (6/7, 86%).

Inoltre abbiamo verificato che l'età di esordio del diabete mellito nel gruppo dei pazienti non polireattivi (T1DM) è significativamente più bassa nei pazienti FasR rispetto a quelli FasS ( $p < 0.01$ ). Tale dato non si riproduce nel gruppo T1DM-p (**Tabella 2**).

Tuttavia è stato evidenziato che all'interno del gruppo dei pazienti polireattivi e nel sottogruppo dei polireattivi con tiroidite, l'età d'esordio della seconda manifestazione autoimmune è significativamente più bassa nei pazienti FasR ( $p < 0.05$ ). Non risultano invece significativi i parametri riguardanti la durata del T1DM, la distribuzione di età, il controllo glicemico e la storia familiare relativa a sindromi autoimmuni (**Tabella 3**).

**Tabella 2:** Età di esordio del diabete e della malattia autoimmune secondaria in pazienti con e senza difetto della funzionalità di Fas.

Gruppo di pazienti	Età di esordio					
	T1DM			Malattia autoimmune secondaria		
	Funzionalità Fas		P <sup>†</sup>	Funzionalità Fas		P
	FasS <sup>‡</sup>	FasR <sup>§</sup>		FasS	FasR	
<b>T1DM</b>	8.7* (7-13) n=36	5 (3.3-6) n=14	<0.01	-	-	-
<b>T1DM-p</b>	9.3 (7.5-12) n=7	6.9 (2-9) n=21	ns	12.9 (11-15)	8.6 (6-12)	<0.05
<b>HT-T1DMp</b>	10 (8-11) n=6	7 (5-8) n=15	ns	13 (10-13.8)	8 (7-9.4)	<0.01

\*: i risultati sono espressi come età di esordio mediana nella popolazione, i range interquartili

sono riportati nelle parentesi

†: analisi statistica condotta con il test Mann-Whitney

‡: Fas-sensibile

§: Fas-resistente

**Tabella 3:** Parametri demografici e clinici dei pazienti con e senza difetto della funzionalità di Fas

Pazienti	Funzione Fas	n*	M/F†	Durata del T1DM‡	Età§	HbA1c	Autoimmunità secondaria			Storia familiare delle autoimmunità n
							Tiroidite	Celiachia	Sclerosi Multipla	
T1DM	FasR¶	14	8/6	6	11	7,7	-	-	-	5
	FasS¶	36	20/16	4	13.4	8,1	-	-	-	12
T1DM-p	FasR	21	4/17	4	15	7,8	15	4	2	8
	FasS	7	2/5	4,5	15	7,6	6	-	1	3

\*: numero di soggetti

†: rapporto maschio/femmina

‡: durata del T1DM (mediana in anni)

§: età all'analisi (mediana in anni)

||: percentuale di emoglobina glicata all'analisi

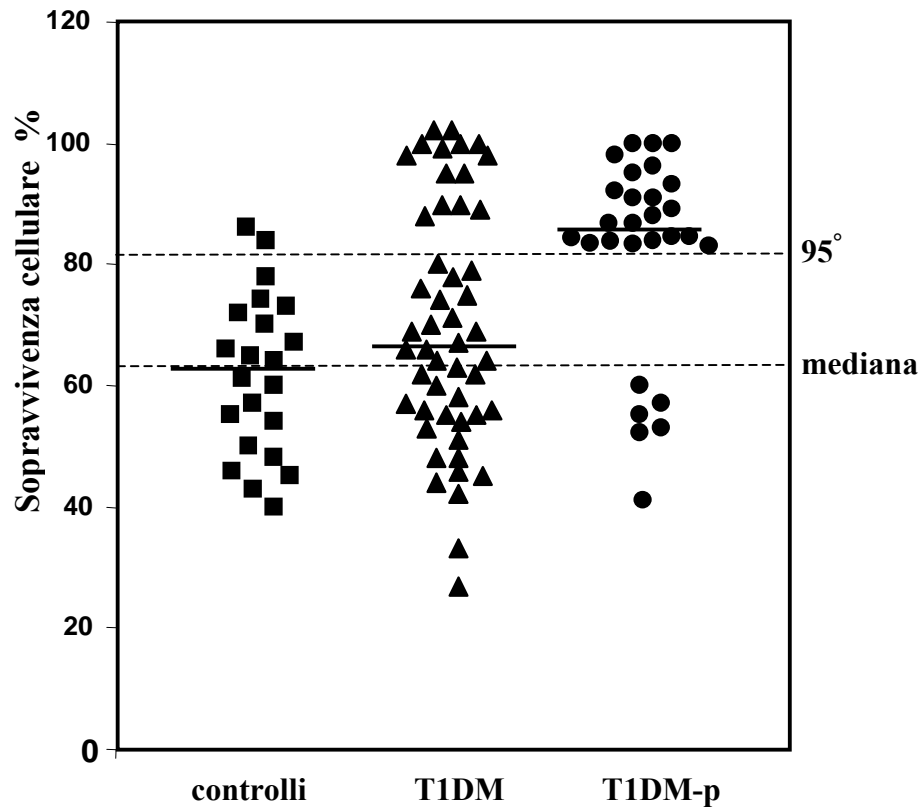
¶: Fas-sensibile (S) and Fas-resistente (R)

### *Analisi della funzionalità del sistema Fas.*

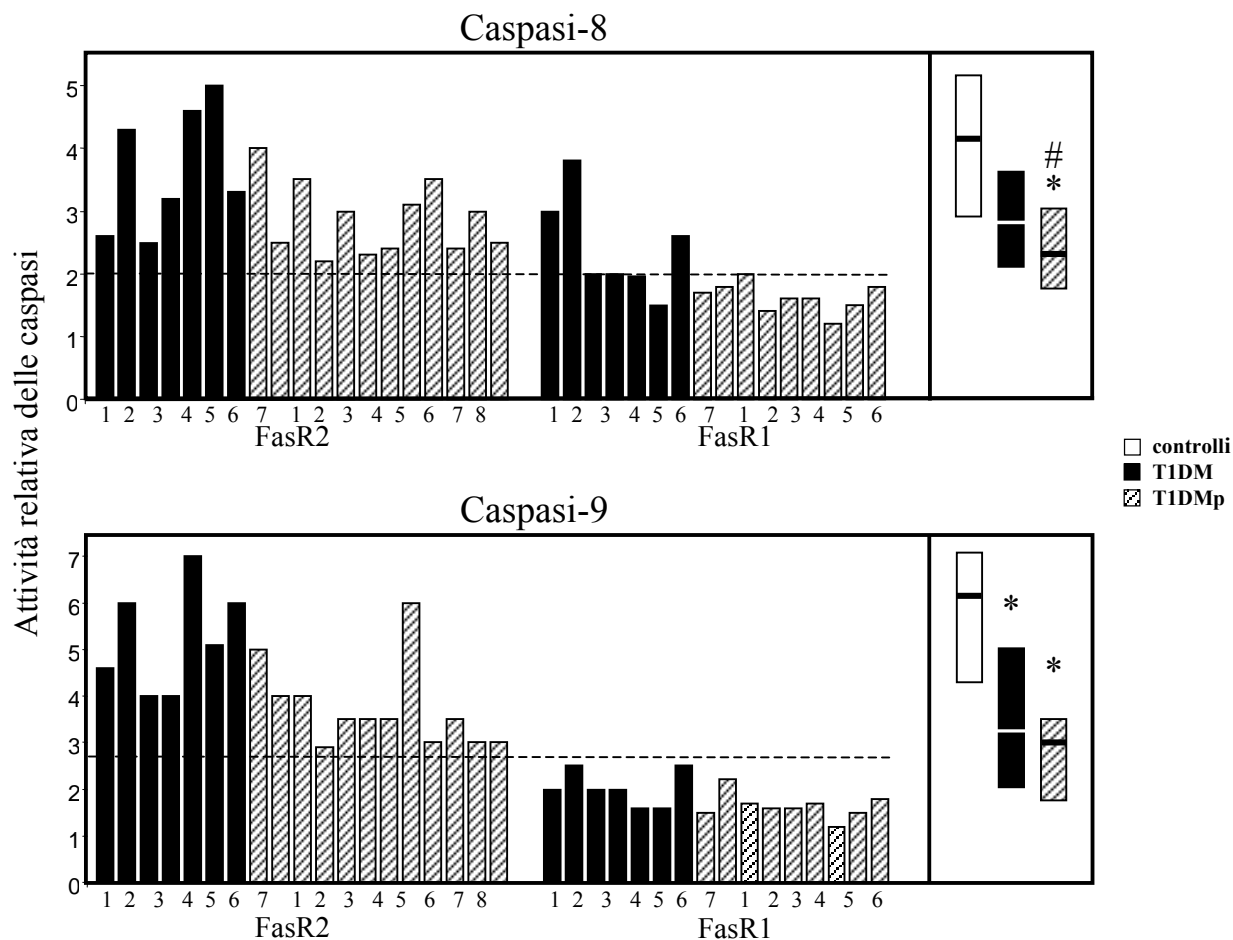
Per analizzare la funzionalità delle vie di traduzione del segnale indotte da Fas (via intrinseca e via estrinseca), è stata valutata l'attivazione delle caspasi-8 e -9 in 35 pazienti FasR (in 14 T1DM e 21 T1DM-p) e 20 controlli sani FasS appaiati per età. Come mostrato in **Figura 2**, i pazienti polireattivi mostrano una riduzione dell'attività di entrambe le caspasi rispetto ai controlli sani (caspasi-8:  $p < 0.001$ ; caspasi-9:  $p < 0.0001$ ; test Mann-Whitney) ed una ridotta attività della sola caspasi-8 rispetto ai pazienti T1DM ( $p < 0.05$ ). D'altra parte i pazienti T1DM mostrano un difetto dell'attività della caspasi-9, ma non della caspasi-8, se paragonati ai controlli ( $p < 0.01$ ).

Abbiamo successivamente condotto un'analisi dei singoli pazienti: è stato possibile notare che 16 dei 35 pazienti FasR (46%) (suddivisi fra 7 T1DM e 9 T1DM-p) mostrano un severo difetto (inferiore al 5° percentile) di una o entrambe le caspasi (sottogruppo FasR1). In particolare fra questi solo 3 (tutti T1DM) mostrano difetto solo in caspasi-9 mentre tutti gli altri mostrano difetto di attivazione di entrambe le molecole. I 19 pazienti rimanenti mostrano una normale attivazione di entrambe le caspasi (sottogruppo FasR2) (**Figura 3**).





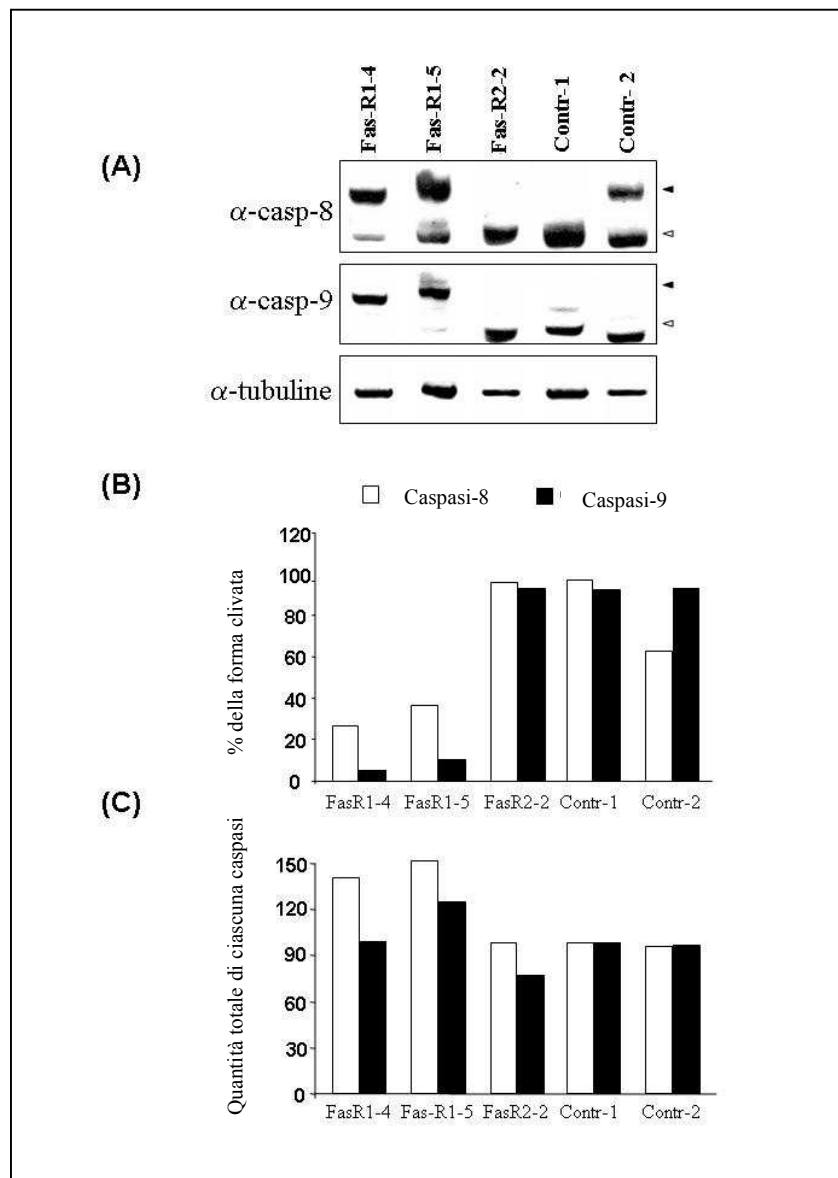
**Figura 2.** Sopravvivenza cellulare a seguito di stimolo di Fas su soggetti di controllo, T1DM e T1DM-p. I risultati sono espressi in percentuale specifica di sopravvivenza cellulare dei campioni trattati con anticorpo agonista anti-Fas rispetto alle cellule non trattate di controllo. La linea alta tratteggiata più alta indica il limite superiore della norma calcolato come 95° percentile sulla popolazione di controllo (n=150), quella inferiore la loro mediana. Le linee continue indicano i valori mediani di ciascun gruppo.



**Figura 3.** Attivazione delle caspasi-8 e -9 dopo attivazione di Fas in linfociti T derivati da pazienti T1DM e T1DM-p. I risultati sono espressi come attività di caspasi relativa rispetto al controllo non stimolato. Nel pannello di sinistra sono mostrati i risultati ottenuti dall'analisi dei singoli soggetti; nel pannello di destra sono riassunte le analisi per ciascun gruppo di pazienti (intervallo interquartile (box) e mediana (linee orizzontali)). I simboli \* e # indicano differenze statisticamente significative rispetto alla popolazione di controllo e rispetto alla popolazione dei pazienti con T1DM.

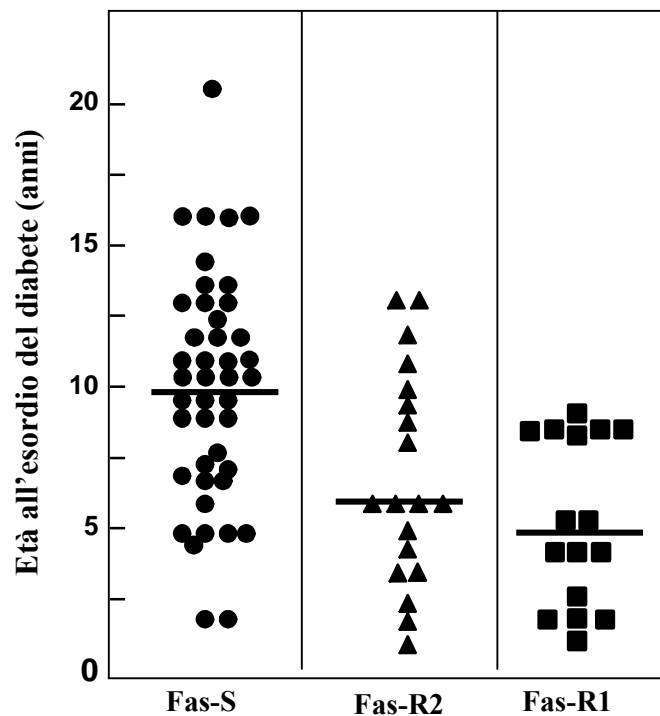
Per analizzare se questo difetto poteva essere imputato ad una difettiva espressione delle due molecole, abbiamo condotto un'analisi tramite Western Blot sugli estratti proteici utilizzati per eseguire il test di attivazione caspatica derivati da 3 soggetti T1DM-p; due appartenenti al sottogruppo FasR1 e uno a quello FasR2, analizzati in parallelo con due soggetti di controllo FasS.

La quantizzazione dei segnali ottenuti dalle forme attive (clivate) e inattive di entrambe le caspasi conferma i dati ottenuti dal test enzimatico (**Figura 4A e 4B**). Inoltre la quantizzazione dell'ammontare totale delle due proteine (attive e non) mostra che il difetto non è ascrivibile ad un alterato livello di espressione proteica. Non si riscontrano infatti differenze fra i soggetti FasR ed i controlli (**Figura 4C**).



**Figura 4.** Analisi tramite Western Blot delle caspasi-8 e -9 su lisati totali derivati da cellule di 2 pazienti T1DM-p FasR1, 1 paziente T1DM-p FasR2 e di 2 controlli FasS. Pannello (A): Western blot con anticorpi diretti verso caspasi-8, caspasi-9 e tubulina. Le frecce nere indicano la forma non clivata, quelle bianche la forma attiva. Pannello (B): Analisi densitometrica per determinare la percentuale della forma clivata rispetto al totale delle proteine. Pannello (C): Analisi densitometrica dell'ammontare totale delle proteine (forma clivata più forma inattiva). I risultati sono relativi al valore mediano dei controllo posto uguale a 100%, e normalizzate sull'ammontare di tubulina per ciascun soggetto.

Avendo inoltre riscontrato che l'età massima di esordio della malattia nei pazienti del sottogruppo FasR1 era pari a 9 anni, abbiamo deciso di utilizzare questo valore come *cut-off* per poter confrontare l'età di esordio della malattia fra i diversi gruppi FasS, FasR2 e FasR1. Questo tipo di analisi ci ha permesso di stabilire che il 100% dei pazienti FasR1 (16/16), il 74% dei pazienti FasR2 (14/17) e il 47% dei pazienti FasS (20/43) hanno mostrato un'età di esordio inferiore a 9 anni. Come mostrato in **Figura 5**, confrontando le età di esordio della malattia nei tre gruppi, si può osservare che la popolazione dei soggetti FasR1 ha sviluppato la malattia precocemente rispetto alle altre due popolazioni (FasR1 vs FasS  $p < 0.0001$ ; FasR1 vs FasR2  $p < 0.05$ ; test Fisher). Inoltre tale analisi ci permette di verificare che la popolazione dei pazienti FasR2 ha un esordio precoce rispetto ai soggetti FasS, anche con valori ai limiti della significatività (FasR2 vs FasS  $p = 0.053$ ; test Fisher).



**Figura 5.** Età di esordio del T1DM in pazienti FasS e pazienti Fas resistenti con attività di caspasi normale (FasR2) oppure deficitaria (FasR1). Le linee continue indicano il valore mediano di ciascun gruppo

Infine, abbiamo valutato la necessità della terapia ormonale sostitutiva fra i 15 pazienti T1DM-p con tiroidite di Hashimoto, stratificando questa popolazione nei gruppi FasR1, FasR2 e FasS. La terapia sostitutiva si è resa necessaria nella totalità dei soggetti FasR1 (6/6), ma solo nel 44% dei soggetti FasR2 (4/9) e nel 16% dei soggetti FasS (1/6). L'analisi di questo gruppo di pazienti, ugualmente distribuiti per sesso, età di esordio e durata della tiroidite, ha evidenziato che i soggetti appartenenti al gruppo FasR1 necessitano terapia ormonale sostitutiva rispetto agli altri gruppi (FasR1 vs FasS  $p < 0.01$ ; FasR1 vs FasR2  $p < 0.05$ ; test Fisher).

## 6.6 *Discussione.*

Questo lavoro è la prosecuzione di uno studio precedente che identificava che una piccola componente di pazienti T1DM, ma un maggior numero di pazienti T1DM-p, mostrassero una alterata funzionalità del sistema Fas/FasL, suggerendo quindi una componente genetica (12articolo). Questo lavoro conferma i dati precedentemente ottenuti in un più ampio numero di pazienti esaminati ed analizza tale difetto in termini di risposta allo stimolo apoptotico e di capacità di attivazione delle caspasi-8 e-9. Inoltre, i nostri risultati permettono di individuare tre distinti sottogruppi, differenziabili tramite la funzionalità di Fas: i pazienti del sottogruppo FasS hanno una normale funzionalità del sistema Fas e delle caspasi, i pazienti definiti FasR1 mostrano difetto in entrambe questi marcatori e il sottogruppo FasR2, nel quale si osserva ridotta funzionalità di Fas ma normale attivazione delle caspasi.

In precedenti lavori svolti su pazienti affetti da sclerosi multipla, artrite reumatoide e CIDP, il nostro laboratorio ha dimostrato che la funzionalità del sistema Fas risultava essere maggiormente ridotta in tutti i pazienti che mostravano segni di un decorso più aggressivo della malattia. I dati ottenuti in questo studio evidenziano, con tre approcci diversi, come questa affermazione risulti essere vera anche per i pazienti affetti da diabete mellito di tipo 1.

Primo, la percentuale di pazienti resistenti allo stimolo apoptotico (FasR) sono molto più frequenti nella popolazione dei soggetti con T1DM-p rispetto a quelli con solo T1DM. Questo suggerisce che la mancata funzionalità del sistema Fas garantisce una sorta di *background* fisiologico molto più pronò allo sviluppo di autoimmunità, favorendo quindi la comparsa di reazioni autoimmuni secondarie.

Secondo, l'alterata funzionalità del sistema apoptotico correla con una più bassa età di esordio della malattia; infatti, l'età di esordio del diabete, nella popolazione dei soggetti con T1DM, e l'età di esordio della seconda malattia autoimmune, nella popolazione dei pazienti polireattivi, risulta essere più bassa fra i pazienti FasR rispetto agli altri.

Terzo, lo studio condotto sui pazienti T1DM-p con tiroidite di Hashimoto, ha evidenziato che il fabbisogno di una terapia ormonale sostitutiva è aumentata nel gruppo FasR1 (100%; FasS 16% FasR2 44%). Dato che la durata della tiroidite risulta però essere uguale fra questi gruppi, è possibile concludere che lo sviluppo dell'ipotiroidismo è causato da un attacco immunologico più aggressivo che porta più rapidamente alla distruzione del tessuto ghiandolare.

E' stato precedentemente dimostrato che la funzionalità del sistema Fas/FasL non è correlata all'età, alla durata della malattia ed al controllo glicemico (9,14 articolo); tuttavia l'analisi dei genotipi HLA in un piccolo gruppo di soggetti ci ha suggerito una possibile cooperazione fra i genotipi HLA e l'alterata funzione di Fas nello sviluppo del T1DM e T1DM-p. Questo dato necessita tuttavia l'analisi di una più vasta coorte di pazienti.

Dal punto di vista molecolare, il difetto di apoptosi che abbiamo riscontrato nei nostri pazienti può essere imputato in ugual misura a difetti delle molecole che trasducono il segnale, sia da una aumentata funzionalità delle proteine inibitrici del segnale stesso.

La differente capacità del recettore Fas di attivare la caspasi-8 e la -9 suggerisce che le alterazioni molecolari a carico dei diversi pazienti siano di differente natura. Nei pazienti che manifestano un deficit di attività in entrambe le caspasi (n=13) è plausibile supporre che il difetto colpisca qualche molecola molto a monte nel segnale Fas-mediato; questo è supportato da un lavoro in cui è stata riportata una diminuita attività della caspasi-8 in pazienti T1DM, a cui si accompagna un maggior grado di reclutamento della molecola inibitoria FLIP nel complesso DISC. In quei soggetti che invece manifestano normale attività delle caspasi (n=19), il difetto funzionale può essere ascritto a molecole che sono situate a valle rispetto alle due caspasi iniziatrici; è già stato infatti dimostrato un deficit di espressione della caspasi-3 (caspasi effettrice) in una popolazione di pazienti T1DM. Infine, i tre pazienti che hanno mostrato un deficit funzionale per la sola caspasi-9, possono essere soggetti ad alterazioni che coinvolgono l'attivazione della sola via intrinseca del segnale apoptotico; teoria da noi già proposta per quei



soggetti che pur avendo una normale risposta allo stimolo Fas-mediato, tuttavia risultano essere resistenti all'apoptosi indotta da stimoli che agiscono sul mitocondrio.

In conclusione questi dati suggeriscono che, oltre a favorire lo sviluppo di T1DM, il deficit del segnale apoptotico Fas-mediato, caratterizza un sottogruppo di pazienti che manifestano un più aggressivo attacco immunologico, caratterizzato da una più precoce età di esordio e un maggior rischio di sviluppare una seconda malattia autoimmune.

Il difetto apoptotico è in grado di favorire l'autoimmunità alterando lo spegnimento della risposta immunitaria e aumentando quindi il rischio di cross-reazione con antigeni *self* (mimetismo molecolare). Lo stesso meccanismo può inoltre favorire l'espansione della risposta immunitaria a seguito del danno iniziale (*epitope spreading*), il che risulterebbe in linea con la precoce età di esordio e la polireattività. Il fallito spegnimento delle risposta immunitaria può secondariamente portare alla necrosi e alla conseguente stimolazione dell'infiammazione, favorendo il mimetismo molecolare.

In questo lavoro, l'alterata funzionalità di Fas può favorire questo processo rallentando lo spegnimento della risposta immunitaria e/o inducendo l'esposizione anormale di antigeni correlati all'apoptosi.

## 7 XIAP E MALATTIE AUTOINFIAMMATORIE

### 7.1 *Sindromi da Febbre Periodica.*

Le sindromi da febbre periodica sono un gruppo di malattie genetiche autoinfiammatorie accomunate da manifestazioni di episodi febbrili generalizzati di tipo periodico e apparentemente *sine causa*, con manifestazioni infiammatorie che colpiscono i distretti serici, sinoviali e cutanei [139-141]. Le sindromi più conosciute e meglio caratterizzate sono: la Febbre Mediterranea Familiare (FMF), dovuta a mutazioni geniche che colpiscono il gene MEFV codificante per la pirina [142]; la Sindrome da Iper IgD (HIDS), causata da mutazioni che colpiscono il gene della mavalonato kinasi (MVK) [143]; la sindrome associata al recettore per il TNF (TRAPS) [144], causata da mutazioni a carico del gene codificante per il recettore del TNF di tipo I; e tre Criopirinopatie, rispettivamente la sindrome di Muckle-Wells (MWS) [145,146], la sindrome autoinfiammatorie familiare (FCAS) [146] e la sindrome cronica infantile Neurologica, Cutanea ed Articolare (CINCA), tutte dovute a mutazioni a carico del gene CIAS1, codificante per la criopirina [145,146]. La trasmissione genetica di queste malattie segue ereditarietà recessiva per la FMF e la HIDS, mentre risulta a carattere dominante per tutte le altre.

Esiste un vasto gruppo di pazienti che manifestano sintomatologie analoghe alle sindromi sopra citate, ma che mancano di mutazioni a carico dei geni ritenuti responsabili delle malattie, e la cui ereditarietà non è chiara. Queste sindromi, qui identificate come febbri periodiche idiopatiche, potrebbero essere dovute a mutazioni in altri geni causali, non ancora identificati. D'altro canto, queste sindromi possono anche essere causate da più variazioni, ciascuna delle quali risulta però insufficiente, da sola, a scatenare la malattia. La concomitante presenza di questa variazioni potrebbe però dare origine al quadro clinico manifesto e molto eterogeneo fra pazienti. E' risaputo che molte sindromi sopra descritte possono manifestare, un particolare

quadro clinico in cui si associano oltre agli attacchi febbrili anche stomatite, faringite essudativa e linfadenite cervicale, e che viene comunemente identificata come sindrome PFAPA [147,148].

E' interessante notare che tutti i geni ritenuti causali nelle sindromi da febbre periodica, codificano per proteine in grado di modulare la funzione e la produzione di importanti citochine infiammatorie quali interleuchina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e TNF- $\alpha$ . Infatti, la pirina e la criopirina sono in grado di influenzare la formazione e la funzionalità dell'*inflammosoma*, un complesso multiproteico coinvolto nell'attivazione della caspasi-1 in grado di digerire proteoliticamente la pro-IL-1 $\beta$ , attivandola [149]. Il meccanismo patogenetico risulta invece meno chiaro nella HIDS, nella quale, le mutazioni a carico del gene MVK influenzano la stabilità e la funzionalità della mevalonato chinasi, portando ad una ridotta produzione di isoprenoidi infiammatori, probabilmente responsabile di una aumentata produzione di IL-1 $\beta$ , da parte dei monociti [150,151]. La patogenesi della TRAPS, in ultimo, risulta essere correlata ad alterazioni nella risposta del recettore per il TNF, a seguito del legame con il suo ligando; questo recettore è in grado di trasdurre due distinti tipi di segnali in grado di indirizzare la cellula sia verso la proliferazione che verso l'apoptosi [152,153].

Da una parte il recettore interagendo con la molecola adattatrice TRADD, è in grado di attivare la traduzione del segnale proliferativo, portando alla traslocazione nucleare di due importanti fattori di trascrizione, NF-kB e AP1, indirizzando la cellula verso lo stadio pro-infiammatorio [154,155]. Nelle sindromi TRAPS questo particolare segnale risulta essere iperattivato a causa o di mutazioni che permettono al recettore di trasmettere il segnale anche in assenza di ligando, o di mutazioni che alterano il normale clivaggio del recettore indotto da attivazione (fenomeno di *shedding*). Quest'ultimo infatti è un importante meccanismo che permette di regolare l'omeostasi del TNF- $\alpha$ , facendo cessare la risposta infiammatoria.

Dall'altra parte, il recettore per il TNF, interagendo con un'altra molecola adattatrice, FADD, porta all'attivazione della caspasi-8, in grado a sua volta di stimolare la via estrinseca e

la via intrinseca (o mitocondriale) del segnale apoptotico [155]. Nelle TRAPS, il mancato funzionamento di questa seconda via, porta ad un deficit nell'apoptosi delle cellule del sistema immunitario, influenzando così un importante meccanismo di down-regolazione della risposta infiammatoria [156-158].

### 7.2 *XIAP e Sindromi da Febbre Periodica.*

Come già accennato nelle sezioni precedenti, XIAP, non solo è un potente inibitore del segnale apoptotico, ma risulta anche essere una molecola importante in alcune vie di traduzione del segnale. In particolare, XIAP prende parte alla modulazione dell'attivazione cellulare poiché è in grado di indurre la traslocazione del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B, di attivare la cascata delle MAP kinasi e di inibire la cascata del segnale di JNK [159]. Questa sua funzione è garantita dall'interazione del suo dominio BIR1 con la molecola adattatrice TAB1, portando alla diretta attivazione della kinasi TAK1 e di NF- $\kappa$ B. Oltre a questo, il dominio RING della molecola, grazie alla sua attività E3 ligasica gioca un ruolo fondamentale nell'attivazione cellulare inducendo la degradazione proteasomica di importanti proteine regolatorie [160-162].

### 7.3 *Scopo.*

Visto che XIAP è in grado di influenzare entrambe i segnali trasdotti dal TNF- $\alpha$ , questo lavoro ha come scopo quello di valutare l'esistenza di alterazioni a carico del gene BIRC4, codificante per questa proteina nei pazienti affetti da febbri periodiche.

Abbiamo individuato una variazione *missense*, Q423P, la cui frequenza allelica è significativamente differente nella popolazione dei pazienti con IPF, rispetto alla popolazione di controllo. Tale distribuzione non è presente invece nei pazienti affetti da TRAPS, HIDS e FMF. Abbiamo dimostrato che l'allele predisponente 423Q, è associato a sua volta ad un aumentato grado di espressione proteica di XIAP, ad una minor risposta attivatoria della caspasi-9 ed a una aumentata risposta dei macrofagi a lipopolisaccaride (LPS). Questi dati sembrano suggerire che

l'allele 423Q possa favorire lo sviluppo delle IPF, possibilmente favorendo la risposta macrofagica.

#### 7.4 *Materiali e Metodi.*

##### *Pazienti.*

I pazienti sono stati reclutati dall'ospedale Gaslini di Genova per essere inseriti in un programma di diagnosi sui disordini auto-infiammatori. Presso di noi sono pervenuti 13 pazienti in cui sono state diagnosticate mutazioni a carico del gene MVK (quindi affetti da HIDS), 16 pazienti con mutazioni a carico del gene MEFV (FMF), 17 con mutazioni a carico del gene TNFRSF1A (TRAPS) e 87, nei quali, non è stata diagnosticata alcuna mutazione in questi geni. I criteri di inclusione in questo studio sono stati: i) attacchi febbrili ( $>38^{\circ}\text{C}$ ) periodici di origine non nota, inframmezzati da periodi di defervescenza in assenza di sintomatologia, ii) almeno due dei seguenti sintomi compresenti durante gli attacchi febbrili: linfadenopatia, splenomegalia, dolori addominali, manifestazioni muco-cutanee, muscolo-scheletriche oppure intestinali. I controlli di pari età per i soggetti pediatrici erano privi di sintomatologie autoimmuni o allergiche. Tutti i soggetti e i parenti dei minori hanno approvato lo studio con consenso informato.

##### *Screening molecolare*

Sono stati sequenziati i geni codificanti per la regione extra-cellulare del recettore per il TNF (esoni dal 1 al 6), i 10 esoni codificanti per il gene della mevalonato kinasi (dal 2 al 11), i dieci esoni codificanti per la MEFV e gli esoni dal 2 al 7 codificanti per XIAP. Le reazioni di PCR e di sequenza sono state condotte secondo le procedure standard e i prodotti sono stati analizzati con il kit ABI PRISM BigDye<sup>TM</sup> Terminator tramite un sequenziatore automatico.

### *Saggio di attività caspasi e Western blot.*

Il saggio di attivazione delle caspasi-9 è stato condotto su linfociti T ottenuti da PBMC derivati da pazienti, attivati con PHA al giorno T0 (1 µg/ml) e coltivate in terreno RPMI 1640 completato con 10% di siero fetale bovino (FBS) e interleuchina-2 (IL-2) (10U/ml). Sette giorni dopo la stimolazione le cellule sono state incubate o no con etoposide (5µg/ml) in ghiaccio per 30 minuti, quindi trasferite a 37°C per 6 ore. Allo scadere dell'incubazione le cellule sono state centrifugate e lisate, quindi l'estratto proteico è stato quantizzato tramite Biorad Protein Assay. Per ciascun test sono stati utilizzati 50µg di lisato totale, analizzati in doppio, corsi in parallelo con altrettanto campione derivato da soggetti di controllo. I risultati sono stati espressi come attività caspasi relativa, ovvero: (attività della caspasi su cellule stimulate/ attività della caspasi su cellule non stimulate) x 100.

Il grado di espressione di XIAP è stato valutato tramite SDS-page e immunoblotting utilizzando 100 µg di lisato cellulare. Le membrane di nitrocellulosa sono state bloccate con TBS contenente 5% latte in polvere e 0,1% Tween-20, incubate per 16 ore con gli anticorpi diretti verso la proteina in esame e verso la tubulina, quindi rilevati con anticorpo secondario coniugato con perossidasi e analizzati in chemiluminescenza. Le bande ottenute sulle lastre sono state quantizzate con il GelDoc EQ system.

### *Real Time PCR.*

L'RNA messaggero è stato estratto ad linfociti T derivati da soggetti di controllo, maschi, emizigoti per la variazione dopo sette giorni di coltura, come descritto in precedenza nella sezione Western Blot, utilizzando il kit NucleoSpin RNAII. 500 ng di mRNA totale sono stati poi retrotrascritti utilizzando il kit ThermoScript RT-PCR System. Le sonde relative all'RNA codificante per XIAP (assay ID: Hs00236913\_m1) e per GUSB (assay ID: Hs99999908\_m1), utilizzato come gene *housekeeping* di controllo, sono state acquistate da Applied Biosystems.

Tutti gli step relativi sono stati eseguiti in un ABI Prism 7000 Sequence Detector, e i dati ottenuti sono stati analizzati tramite metodo del Cycle Threshold.

*Mini-library su colonie batteriche.*

L'RNA messaggero è stato estratto ad linfociti T derivati da soggetti di controllo, femmine, eterozigoti per la variazione dopo sette giorni di coltura, come descritto in precedenza nella sezione Western Blot, utilizzando il kit NucleoSpin RNAII. 500 ng di mRNA totale sono stati poi retrotrascritti utilizzando il kit ThermoScript RT-PCR System. I prodotti di retrotrascrizioni sono stati quindi ligati in un vettore pGEM-T e trasformati in batteri JM109. Le colonie cresciute su terreno selettivo sono state quindi sottoposte a PCR ed i relativi prodotti sequenziati.

*Costruzione e trasfezione dei costrutti in fusione con GFP.*

Per la costruzione dei vettori contenenti le due varianti di XIAP, abbiamo amplificato la porzione del cDNA contenente il polimorfismo utilizzando oligonucleotidi contenenti appositi siti di restrizione, compatibili con la sequenza genica. I frammenti ottenuti dall'amplificazione sono stati quindi digeriti con enzimi di restrizione opportuni, così come anche il vettore pEGFP. A seguito della digestione i frammenti ed il vettore sono stati purificati e utilizzati come componenti per una reazione ligasica, quindi trasformati in batteri JM109. Le colonie cresciute su terreno selettivo sono state quindi analizzate tramite PCR e sequenziamento per verificare il corretto inserimento dei frammenti nel vettore, in accordo con la cornice di lettura per la corretta trascrizione e traduzione delle proteine di fusione con la GFP (green fluorescent protein). I costrutti così ottenuti sono stati amplificati e utilizzati per trasfettare cellule 293T tramite incubazione con lipofectamina.

#### *Immunofluorescenza su vetrino.*

Le cellule trasfettate con i differenti costrutti sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti nei quali era stato precedentemente posizionato un vetrino coprioggetto. Dopo 24 ore dalla trasfezione i vetrini coprioggetto sono stati recuperati e montati tramite Mowiol su vetrini portaoggetto e quindi analizzati direttamente al microscopio confocale. Non si è reso necessario colorare le cellule con specifici anticorpi, per via del fatto che le varianti trasfettate erano fuse con GFP, in grado di emettere spontaneamente fluorescenza quando eccitata da luce blu.

#### *Differenziamento dei macrofagi e analisi delle citochine.*

I macrofagi derivati dai monociti di soggetti di controllo di sesso maschile sono stati differenziati per 5 giorni in terreno RPMI 1640 con 5% FBS, 25 mM HEPES, in presenza di GM-CSF (800U/ml), quindi attivati con LPS. I surnatanti di coltura sono stati raccolti 24 ore dopo lo stimolo con LPS per la misurazione delle citochine. La produzione di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 è stata misurata tramite specifici kit ELISA (R&D Systems).

#### *Analisi statistica.*

Abbiamo utilizzato un test  $X^2$  per determinare l'eterogeneità delle popolazioni fra i differenti sottogruppi clinici in accordo con la suddivisione dei genotipi. Al fine di poter correlare il genotipo con il fenotipo dei pazienti abbiamo suddiviso i pazienti a seconda della presenza del solo allele A (maschi A e femmine A/A; GenotipoA) e confrontati ai pazienti che possedevano almeno un allele C (maschi C e femmine A/C e C/C; GenotipoC). L'associazione fra genotipo e fenotipo è stata analizzata utilizzando un modello di regressione logistica con variabile dipendente. Tutti i dati funzionali sono stati analizzati tramite un test non parametrico Mann-Whitney U.



## 7.5 *Risultati.*

### *Analisi del gene BIRC4 nelle sindromi da febbre periodica.*

Abbiamo analizzato tutti gli esoni (1-6) e le giunzioni esone-introne del gene BIRC4 in una popolazione di 87 pazienti con IPF e in 224 soggetti di controllo sani. Tutti i pazienti inclusi mostrava episodi infiammatori ricorrenti con febbre, dolori addominali, mialgia, congiuntivite, edema periorbitale e atralgia, e nessuno di questi presentava mutazioni causali delle differenti sindromi TRAPS, HIDS e FMF.

Nell'analisi delle sequenze è stata riscontrata una variazione allelica, in cui l'Adenina in posizione 1268 (numerazione della base nel cDNA con ATG=+1) viene sostituita da una Citosina (1268A/C) (rs5956583); questa variazione si traduce in un cambiamento aminoacidico in posizione 423, dove una Glutamina viene sostituita da una Prolina. Confrontando le due popolazioni abbiamo potuto verificare che l'allele 423Q risulta essere significativamente più frequente nella popolazione dei pazienti IPF rispetto ai controllo (77.6% contro 62.4%), conferendo un rischio circa due volte più alto (OR=2.08; CI 1.27-3.44; p=0.0029 ) di sviluppare la malattia. (**Tabella 4**).

Come accennato nell'introduzione, il gruppo delle IPF comprende probabilmente un gruppo di malattie molto eterogenee; per tentare di ridurre tale eterogeneità, abbiamo suddiviso questa popolazione in due sottogruppi, in base alla presenza (n=47) o assenza (n=40) del fenotipo PFAPA. Ripetendo l'analisi a seguito di questa suddivisione, abbiamo riscontrato che l'allele 423Q risulta essere preferenzialmente espresso nella popolazione dei soggetti "non-PFAPA", nella quale la variante 423Q, espresso dal 81.4% dei soggetti (contro il 62.4% nella popolazione di controllo), conferisce un OR=2.63 (CI 1.26-5.57) con un p=0.0075. Al contrario, la frequenza dell'allele 423Q risulta essere molto minore nella popolazione dei soggetti PFAPA, e non significativamente differente rispetto alla sua distribuzione nella popolazione di controllo

(p=0.09) (**Tabella 4**). Tutti i risultati relativi a queste popolazioni, non hanno mostrato differenze in base al sesso dei pazienti.

**Tabella 4.** Frequenza allelica del polimorfismo 1268A/C (Q423P) nelle popolazioni dei pazienti affetti da IPF e dei controlli.

<b>1268A&gt;C</b>						
			<b>A</b>	<b>C</b>	<b>OR (95%CI)</b>	<b>p</b>
	<b>Fenotipo</b>	<b>Sesso</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>		
<b>Controlli</b>		Total (n=224)	216 (62.4)	130 (37.6)		
		M (n=102)	62 (60.1)	40 (39.2)		
		F (n=122)	154 (63.1)	90 (36.9)		
<b>IPF</b>	<b>TOTALI</b>	Total (n=87)	97 (77.6)	28 (22.4)	2.08 (1.27-3.44)	0.0029
		M (n=49)	38 (77.6)	11 (22.4)		
		F (n=38)	59 (77.6)	17 (22.4)		
	<b>PFAPA</b>	Total (n=47)	49 (74.2)	17 (25.8)	1.73 (0.93-3.28)	0.09
		M (n=28)	21 (75)	7 (25)		
		F (n=19)	28 (73.7)	10 (26.3)		
	<b>Non PFAPA</b>	Total (n=40)	48 (81.4)	11 (18.6)	2.63 (1.26-5.57)	0.0075
		M (n=21)	17 (81)	4 (19)		
		F (n=19)	31 (82.6)	7 (17.4)		

Questi dati suggeriscono quindi che la variante 423Q di XIAP, possa essere un fattore di rischio per lo sviluppo delle febbri periodiche idiopatiche. Per analizzare se tale effetto può influenzare anche le sindromi in cui è stata riscontrata mutazione causale, abbiamo sequenziato il gene BIRC4 in 13 pazienti con HIDS (portatori di mutazioni a carico del gene MVK), 17 pazienti TRAPS (con mutazioni a carico del TNFRSF1A) e 16 pazienti con FMF (con mutazioni a carico del gene MEFV). Come mostrato in **Tabella 5**, la frequenza allelica della variante 423Q non risulta significativamente differente, in queste popolazioni, rispetto ai controlli.

**Tabella 5.** Distribuzione delle frequenze del polimorfismo 1268A>C (Q423P) in HIDS, TRAPS, FMF e popolazione di controllo (CTR).

		1268A>C			
	Sesso	A	C	statistica	
Soggetti	M/F	N (%)	N (%)	OR	p
CTR (n=224)	102/122	216 (62.4)	130 (37.6)		
HIDS (n=13)	7/6	12 (63.2)	7 (36.8)	1.03 (0.37-2.98)	0.86
TRAPS (n=17)	10/7	15 (62.5)	9 (37.5)	1.00 (0.40-2.56)	0.83
FMF (n=16)	9/7	16 (69.6)	7 (30.4)	1.38 (0.52-3.80)	0.64

Il sequenziamento del gene BIRC4 ha individuato altri due polimorfismi, in posizione 1506A/G (rs28382740) e in posizione 1574G/C (rs12838858), localizzati nel 3' non tradotto, rispettivamente a 12 e 80 paia di basi a valle del codone di stop, ma la loro frequenza risulta essere uguale in tutte le popolazioni di pazienti e in quella dei controlli, senza distribuzione per sesso.

La distribuzione genotipica di tutte le variazioni non devia significativamente dall'equilibrio di Hardy-Weinberg.

In **Tabella 6**, è stata riportata la distribuzione genotipica in base alle differenti diagnosi, dove con PF è stata individuata la popolazione unitaria dei pazienti TRAPS, FMF e HIDS. Su queste popolazioni è stato inizialmente condotto un test Chi-quadro per analizzare l'eterogeneità delle popolazioni stesse. Questo test ha permesso di stabilire che la distribuzione dei genotipi è sbilanciata all'interno dei tre gruppi ( $p=0.015$ ). Abbiamo quindi suddiviso i pazienti portatori del solo allele A (maschi A e femmine A/A), identificando questo gruppo come *GenotipoA*, da quelli portatori di almeno un allele C (maschi C e femmine A/C e C/C), classificandoli come *GenotipoC*.

**Tabella 6.** Tabella descrittiva della distribuzione dei genotipi all'interno delle popolazioni dei controlli, delle febbri idiopatiche senza distinzione fra fenotipo PFAPA e "non-PFAPA" (IPF) e delle febbri con mutazioni note, TRAPS, HIDS e FMF, riunite in unico gruppo (PF).

		Genotipo			Totale
		A or A/A	A/C	C or C/C	
IPF	Unità	60	15	12	87
	%	69.0%	17.2%	13.8%	
PF	Unità	26	8	11	45
	%	57.8%	17.8%	24.4%	
Controlli	Unità	108	62	54	224
	%	48.2%	27.7%	24.1%	
Totale	Unità	194	85	77	356
		54.5%	23.9%	21.6%	

Test Chi-quadro per l'eterogeneità delle popolazioni = 12.3,  $p=0.015$ .

Analizzando a questo punto la distribuzione dei due gruppi tramite un test di regressione logistica, abbiamo potuto verificare che, anche in questo caso, il GenotipoA risulta essere molto più rappresentato nella popolazione delle IPF rispetto a quella dei controlli (OR=2.4; CI 1.4-4.0; con  $p=0.001$ ). Lo stesso tipo di analisi non ha rilevato una significativa differenza fra la popolazione PF ed i controlli (OR=1.6; CI 0.8-3.4; con  $p=0.20$ ).

Non viene confermata, in questo tipo di analisi, la differenza che si riscontrava nell'analisi allelica fra i pazienti PFAPA ( $n=47$ ) e quelli definiti "non-PFAPA"; nei primi il GenotipoA è presente nel 37% dei casi, mentre negli ultimi solo per il 25% (OR=1.7; CI 0.7-4.3; con  $p=0.26$ ).

Nel tentativo di associare al GenotipoA una correlazione con il fenotipo clinico nella popolazione delle IPF, abbiamo condotto una analisi tramite regressione logistica univariata, considerando tutti i differenti sintomi come variabili binarie (presenza/assenza di un particolare sintomo, età di esordio superiore o inferiore ai 24 mesi), mantenendo come continua covariata la durata della febbre. Al termine del modello abbiamo potuto riscontrare che la presenza del GenotipoA risulta essere associata, anche se in maniera molto blanda, con una precoce età di esordio ( $p=0.06$ ) e all'assenza di faringite essudativa ( $p=0.04$ ).

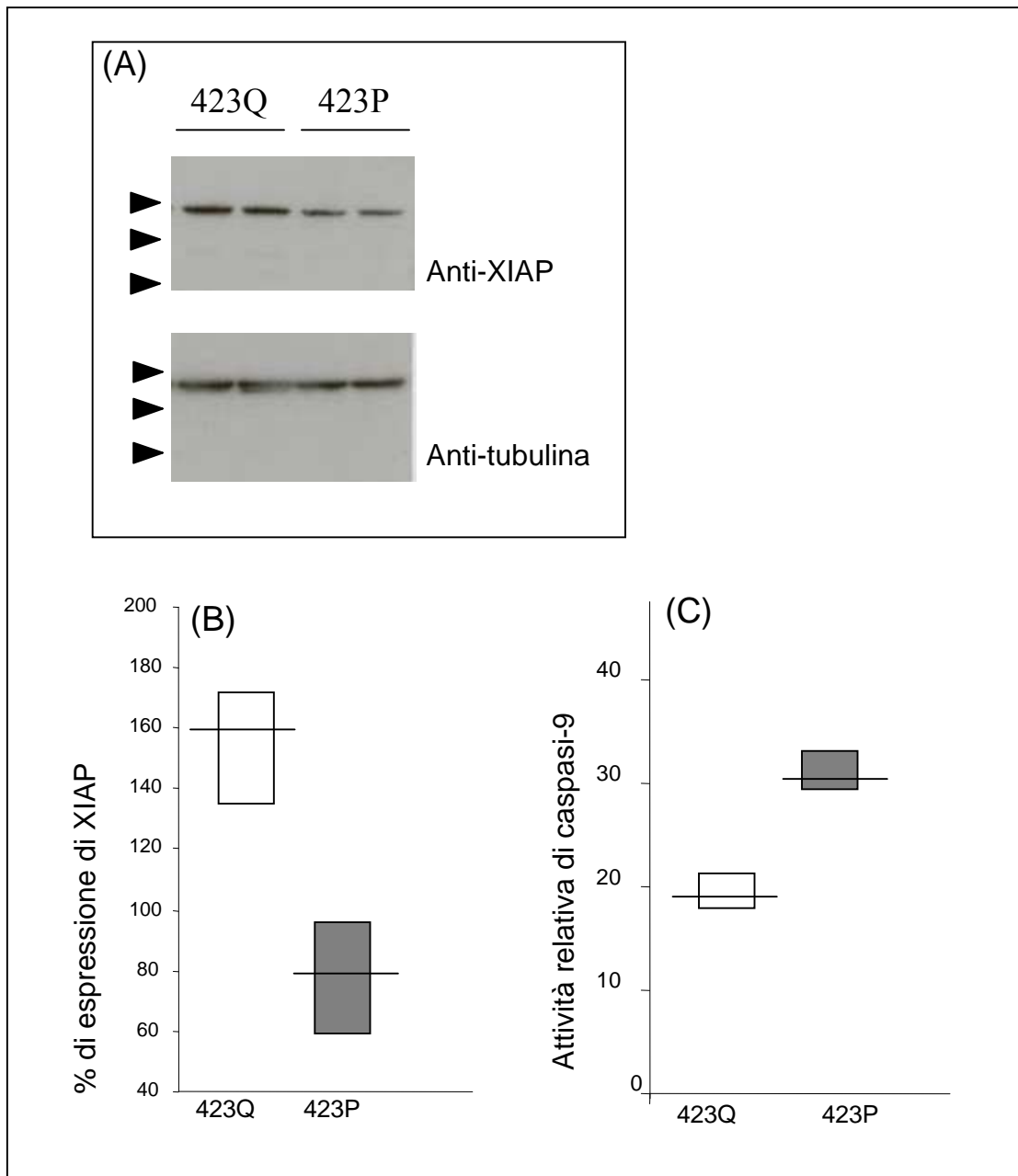
#### *Il polimorfismo Q423P associa ai livelli proteici e di mRNA di XIAP.*

Al fine di analizzare se il polimorfismo Q432P influenza l'espressione o la funzionalità di XIAP, abbiamo analizzato l'espressione di questa proteina e la funzionalità della caspasi-9, che è soggetta all'inibizione mediata da XIAP, in linfociti T, derivati da sangue periferico di soggetti di controllo sani, portatori dell'una o dell'altra variante, di sesso maschile.

L'espressione di XIAP è stata valutata tramite Western Blot, condotto su lisato totale delle cellule al settimo giorno di coltura dopo attivazione con PHA (1 $\mu$ g/ml). Come mostrato in **Figura 6A e 6B**, i soggetti portatori della variante 423Q ( $n=9$ ) risultano avere più alti livelli

della proteina rispetto agli altri (n=8). L'analisi densitometrica dei segnali ottenuti su lastra, e normalizzati per i loro corrispondenti valori di tubulina, ha dimostrato che questa differenza è significativa (p=0.0038) e che la variante 423Q produce circa quantità doppie di proteina rispetto alla variante 423P (media  $\pm$  DS in unità arbitrarie: 151 $\pm$ 32 contro 81 $\pm$ 29).

L'attività della caspasi-9 è stata valutata tramite un test enzimatico fluorimetrico sui lisati totali dopo aver trattato o meno le cellule con etoposide, come stimolo apoptotico mitocondriale. I risultati ottenuti da questi esperimenti hanno dimostrato che, in linea con la differente espressione di XIAP, l'attività della caspasi-9 risulta essere diminuita nei soggetti portatori della variante 423Q (n=5) rispetto agli altri (n=5) (media  $\pm$  DS in unità arbitrarie: 185 $\pm$ 49 contro 346 $\pm$ 117; p=0.02) **Figura 6C**.

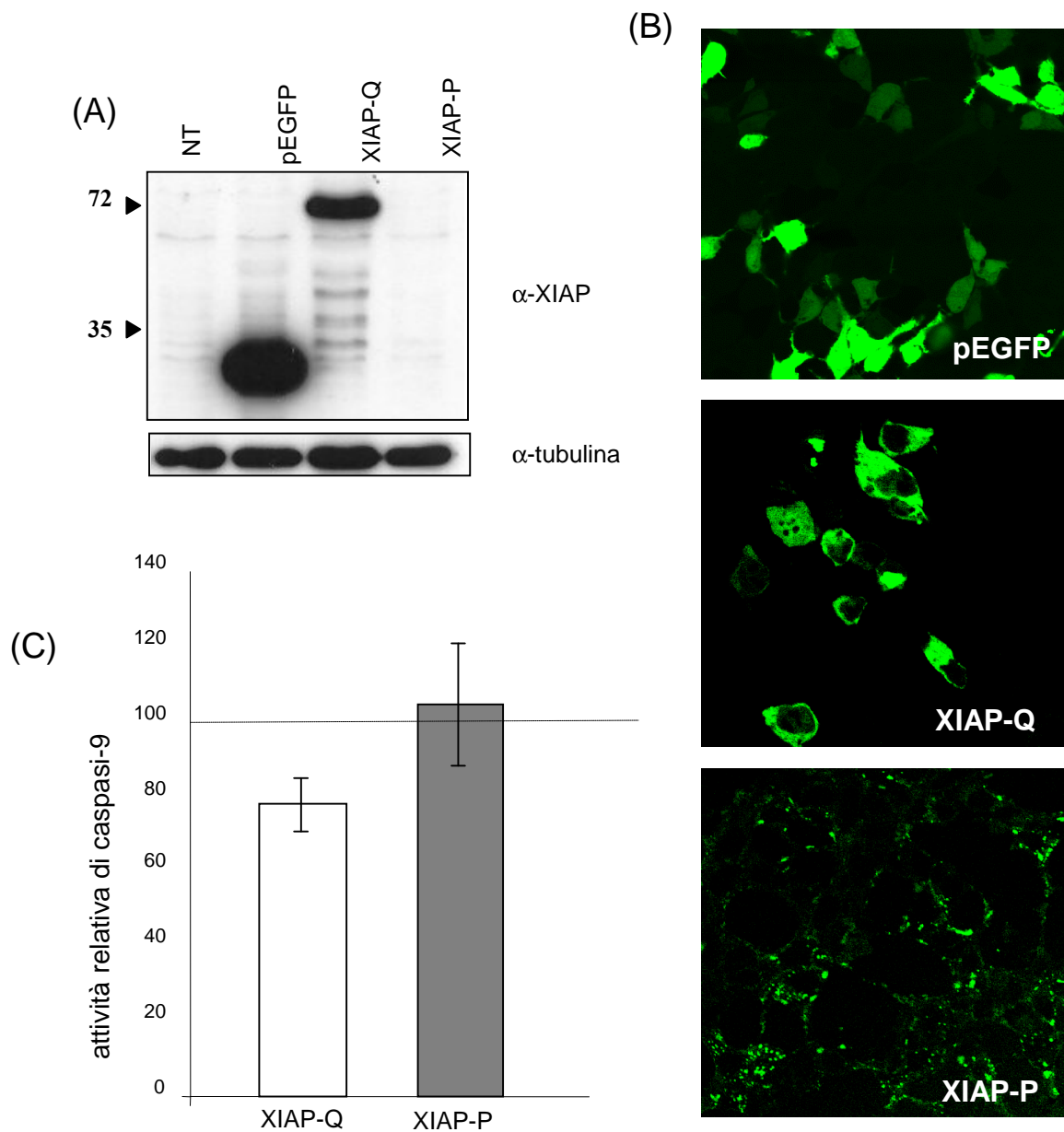


**Figura 6.** Analisi tramite Western Blot dell'espressione di XIAP e dell'attività di caspasi-9 su PBMC derivati da soggetti di controllo de sesso maschile. Pannello (A): western blot rappresentativo fra tutti quelli eseguiti, sviluppato con anticorpi monoclonali diretti verso XIAP e tubulina. Pannello (B): analisi densitometrica dell'espressione di XIAP normalizzata rispetto all'ammontare di tubulina di ciascun soggetto. I dati sono riportati in percentuale rispetto alla mediana dei valori di ciascun singolo esperimento. Pannello (C): Attivazione della caspasi-9 indotta da etoposide rilevato tramite fluorimetria. I risultati sono espressi in attività relativa della caspasi. I box rappresentano gli intervalli interquartile; le linee orizzontali rappresentano il valore mediano.

I dati ottenuti suggeriscono che il polimorfismo Q423P è in grado di influenzare non solo l'espressione di XIAP, ma anche la sua capacità di inibire la caspasi-9. Per confermare questi dati abbiamo clonato le due forme 423Q e 423P in un vettore di espressione eucariota, pEGFP, producendo così i due costrutti GFP-XIAP-Q e GFP-XIAP-P, utilizzati poi per trasfettare cellule 293T. Ventiquattro ore dopo la trasfezione, in cui il vettore vuoto è stato utilizzato come controllo (GFP-mock), abbiamo analizzato l'espressione dei costrutti trasfettati tramite western blot (**Figura 7A**) e microscopia confocale (**Figura 7B**) sui lisati totali, utilizzando un anticorpo anti-GFP. Gli stessi lisati sono stati utilizzati per il saggio fluorimetrico di attività della caspasi-9 (**Figura 7C**).

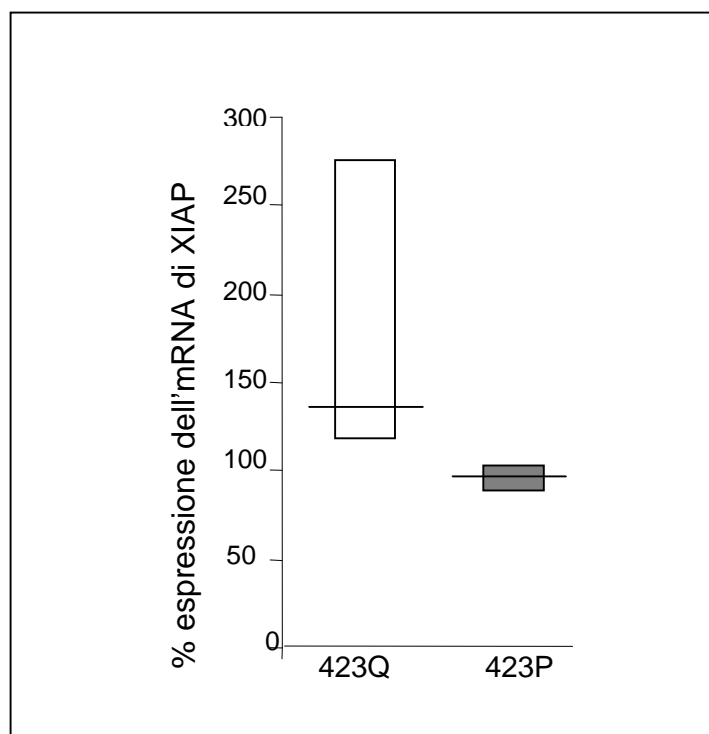
L'analisi al microscopio e quella tramite Western Blot hanno mostrato che il costrutto GFP-XIAP-P è meno espresso rispetto al costrutto GFP-XIAP-Q e al controllo GFP-mock, che mostrano, invece, lo stesso grado di espressione se paragonati fra di loro. Inoltre, l'attività enzimatica della caspasi-9 è diminuita nelle cellule trasfettate con il GFP-XIAP-Q rispetto a quelle trasfettate con il GFP-XIAP-P ( $p=0.021$ ), il quale presenta un grado di attività del tutto paragonabile a quello del controllo.





**Figura 7.** Analisi dell'espressione dei costrutti GFP-XIAP-Q e GFP-XIAP-P in cellule 293T trasfettate in transiente con i relativi costrutti. Pannello (A): Western blot condotto sui lisati totali delle cellule trasfettate, sviluppato utilizzando anticorpi monoclonali anti-XIAP e anti-tubulina. Pannello (B): Analisi delle cellule trasfettate tramite microscopia confocale. Pannello (C) Attività della caspasi-9 dopo 12 ore di trasfezione. I risultati sono espressi in unità arbitrarie di fluorescenza lette dallo strumento.

Per verificare se la variazione Q423P ha anche un effetto sulla produzione dell'RNA messaggero, abbiamo inizialmente prodotto delle *mini-libraries* specifiche per BIRC4 a partire da cDNA di 4 soggetti di controllo femminili eterozigoti per l'allele, e le abbiamo valutate mediante sequenziamento. L'analisi di 153 colonie derivati da cloni indipendenti ha permesso di dimostrare che la variante 423Q risulta essere maggiormente espressa (da 1.5 a 3 volte maggiore) rispetto alla controparte 423P ( $p=0.0042$ ) (**Tabella 7**). Poiché tale differenza potrebbe essere dovuta a una preferenziale selezione, in vivo o in vitro, delle cellule 423Q, abbiamo quantificato l'RNA messaggero codificante per XIAP tramite RealTime PCR, in cellule derivate da soggetti di controllo emizigoti per le variazioni, di sesso maschile. I risultati ottenuti hanno dimostrato che i portatori della variante 432Q ( $n=5$ ) producono più alti livelli di RNA messaggero rispetto ai portatori della variante 423P ( $n=6$ ) ( $p=0.05$ ) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Espressione dell'RNA messaggero codificante per XIAP in maschi emizigoti per le due varianti. I risultati sono espressi in percentuale dei valori CT calcolati dallo strumento, rapportati fra loro ponendo a 100% la media dei valori dei soggetti portatori della variante XIAP-P.

**Tabella 7.** Distribuzione dell'RNA messaggero codificante per le due forme 423Q e 423P in quattro soggetti di controllo eterozigoti di sesso femminile.

<b>Donatori</b>	<b>423Q<sup>a</sup></b>	<b>423P</b>
1	25 (76%)	8 (24%)
2	45 (68%)	21 (32%)
3	24 (71%)	10 (29%)
4	12 (60%)	8 (40%)
TOT	106 (69%)	47 (31%)
	P=0.042	

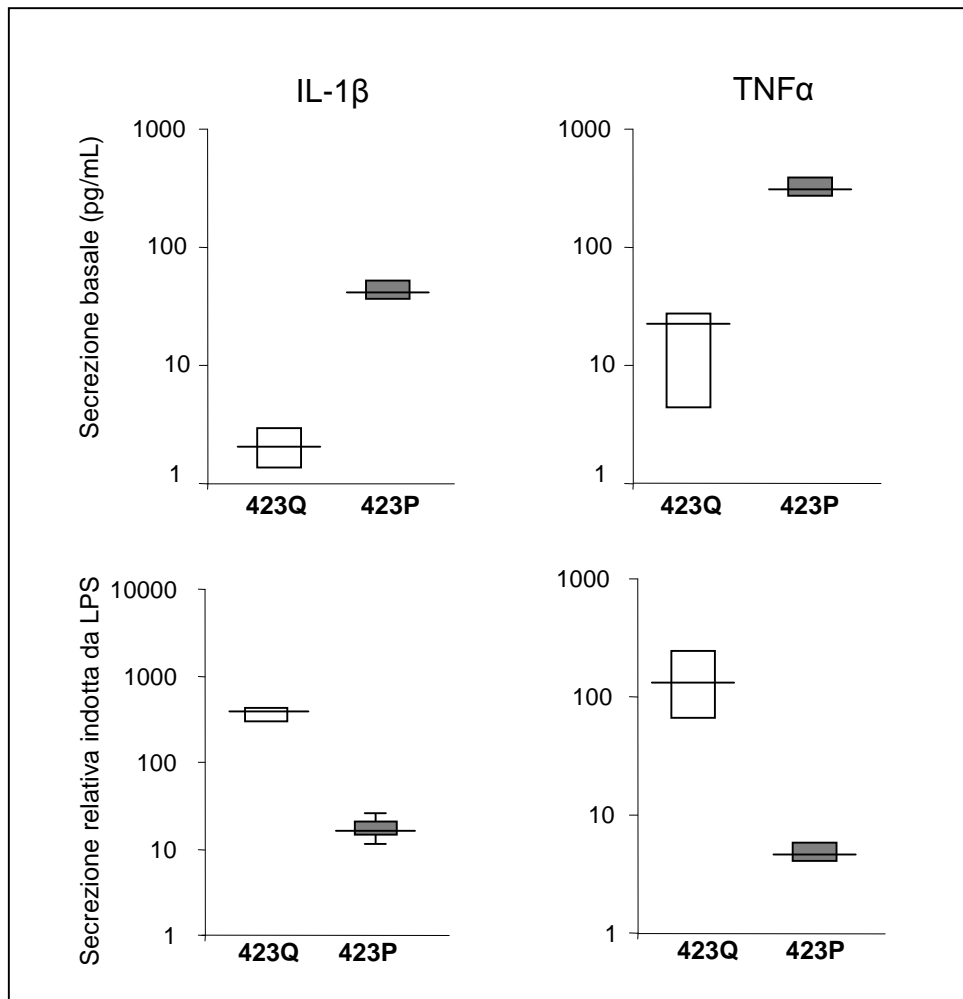
a: i risultati sono espressi come numero di colonie per ciascuna variante; le percentuali relative a ciascun soggetto sono riportate fra parentesi.

*Il polimorfismo Q432P correla con l'attività macrofagica.*

I macrofagi sono oramai riconosciuti come cellule chiave della risposta infiammatoria e sembrano giocare un ruolo importante nelle risposte infiammatorie sistemiche che caratterizzano le febbri ricorrenti. Per questa ragione abbiamo deciso di valutare se la variazione Q423P potesse influenzare la funzionalità macrofagica, analizzando la secrezione di citochine, in particolare IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10, in macrofagi derivati da soggetti di controllo di sesso maschile, portatori dell'una o dell'altra variante.

I monociti derivati da sangue periferico sono stati differenziati in macrofagi per 5 giorni in presenza di GM-CSF e quindi attivati o no con LPS (1 $\mu$ g/ml). Ventiquattro ore dopo la stimolazione abbiamo misurato tramite test ELISA la quantità di citochine presenti nel surnatante, mentre i macrofagi sono stati utilizzati per indurre proliferazione di linfociti allogenici in un saggio MLR (mixed leukocytes reaction) (dati non mostrati).

L'analisi delle citochine secrete ha dimostrato che i macrofagi dei soggetti portatori della variante 423Q producono livelli molto più bassi di TNF- $\alpha$  (circa 10 volte) e IL-1 $\beta$  (circa 20 volte) in assenza di LPS (**Figura 9**), rispetto agli altri con la variante 423P, ma che, a seguito di stimolazione, raggiungono entrambe valori comparabili. Analizzando quindi la capacità del LPS di aumentare la secrezione di queste due citochine, rispetto ai loro valori basali, mostra che l'aumento delle citochine a seguito di stimolo attivatorio, risulta essere molto più potente (circa 20 volte per IL-1 $\beta$  e circa 30 volte per il TNF- $\alpha$ ) nei macrofagi portatori della variante 423Q rispetto a quelli con la 423P (**Figura 9**). I dati relativi alla secrezione di IL-10 non hanno, invece, mostrato nessuna differenza fra le due varianti, sia analizzando i livelli basali che quelli dopo stimolazione.



**Figura 9.** Secrezione di IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  in MDM derivati da soggetti portatori delle due varianti di sesso maschile. Pannello superiore: secrezione basale delle due citochine (pg/ml) da MDM non stimolati. Pannello inferiore: incremento della secrezione delle due citochine dopo stimolazione delle cellule con LPS, in riferimento alla secrezione basale. I box rappresentano l'intervallo interquartile, le linee orizzontali i valori mediani.

## 7.6 *Discussione.*

Questo lavoro ha dimostrato come un comune polimorfismo nel gene di XIAP (423Q), localizzato a livello proteico fra il dominio BIR3 e il dominio RING, possa agire come fattore di predisposizione per lo sviluppo di sindromi da febbre periodica in assenza di una mutazione causale, fra quelle già riconosciute essere responsabili di questa malattia. Tale predisposizione è data dal fatto che questa variazione è in grado di alterare l'espressione della proteina e influenzare la secrezione dei TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  da parte dei macrofagi.

Il primo punto di questo progetto ha stabilito che la frequenza della variante 423Q è molto più elevata nella popolazione dei pazienti con IPF rispetto ai controlli, conferendo un rischio due volte maggiore di sviluppare la malattia. Inoltre, l'aver osservato che questa variazione è molto frequente nella popolazione sana e che non risulta associata nelle popolazioni di pazienti con TRAPS, HIDS e FMF, permette di indicare la variante 423Q come fattore predisponente la malattia, il cui effetto risulta però evidente solo in assenza di forti mutazioni causali, quali quelle a carico dei geni *TNFRSF1A*, *MVK* e *MEFV*. Una delle ipotesi plausibili è che la variazione 423Q possa agire in collaborazione con altre mutazioni in un gene ancora non noto, coinvolto nello stesso meccanismo di XIAP, o alternativamente, che la variazione possa partecipare in un più ampio *background* oligogenico, dove ciascun gene ha un piccolo effetto nello sviluppo delle IPF.

I pazienti affetti da IPF costituiscono un gruppo molto eterogeneo con differenti sintomatologie accumulate dalla sola presenza di attacchi febbrili periodici e ricorrenti. In accordo con i criteri diagnostici correnti [163], il 50% circa dei nostri pazienti IPF possono essere classificati come portatori della sindrome PFAPA. Non è stata riscontrata nessuna differenza nella frequenza genotipica della variante 423Q fra i due gruppi PFAPA e non-PFAPA. Se si analizza invece la sola frequenza allelica, si può notare che la variazione 423Q risulta essere significativamente associata alla popolazione dei pazienti non-PFAPA. Questa disparità dei dati può essere attribuita al numero esiguo di pazienti analizzati. Dati recenti hanno

sollevato parecchie discussioni riguardo alla possibilità e all'affidabilità dei criteri correnti, di riuscire a distinguere un omogeneo sottogruppo di pazienti con febbre periodica. Applicando infatti questi criteri ad un largo numero di pazienti con febbre periodica, abbiamo potuto classificare come PFAPA, un gran numero di pazienti con mutazione nei geni candidati (soprattutto nella MVK); questo ad indicare una bassa specificità dei criteri in utilizzo. Tuttavia, in accordo con diversi autori, solo la presenza di faringite essudativa, e non degli altri criteri diagnostici, può essere utilizzata come marcatore della sindrome PFAPA. La presenza o assenza del polimorfismo 423Q non ci ha permesso di identificare un fenotipo chiaro all'interno della popolazione degli IPF. L'analisi multivariata che è stata effettuata sulla popolazione ha dimostrato solo che la presenza del GenotipoA (maschi A e femmine A/A) può essere debolmente associata ad una più bassa età di esordio della malattia, mentre la presenza di faringite essudativa correla con la presenza del GenotipoC (maschi C e femmine A/C e C/C).

In secondo luogo, tre differenti tipi di analisi hanno dimostrato che la variante 423Q è in grado di indurre una maggiore espressione della proteina rispetto alla variante 423P.

Primo, comparando l'espressione della proteina in cellule derivate da donatori di sesso maschile sani, portatori della variante 423Q o della 423P, abbiamo dimostrato che i primi esprimono quantità di XIAP circa doppie rispetto agli altri.

Secondo, comparando l'espressione della proteina in cellule trasfettate con l'una o l'altra variante, abbiamo notato che la variante 423Q risulta più espressa rispetto alla 423P.

Terzo, analizzando l'RNA messaggero a partire da soggetti femminili di controllo, eterozigoti per i due alleli, abbiamo dimostrato che l'RNA codificante per la forma 423Q risulta essere maggiormente presente. Questi dati suggeriscono che la differenza di espressione che abbiamo riscontrato, è, in parte, dovuta alla stabilità o alla processazione dell'RNA codificante per XIAP. La differente quantità di proteina prodotta risulta essere tale da influenzare l'attivazione della caspasi-9, uno dei principali bersagli dell'inibizione da parte di XIAP; dato confermato dal fatto che le forme 423Q, derivate da soggetti portatori oppure da trasfezione di

cellule 293T, mostrano un più basso grado di attivazione caspasi a seguito di stimolo con etoposide, rispetto alle loro controparti 423P.

In ultimo punto, le differenze di espressione delle due forme di XIAP sembrano influenzare la risposta infiammatoria in modo molto complesso. I macrofagi portatori della variante 423P producono più alti livelli basali di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  rispetto a quelli portatori della variante 423Q, ma analizzando l'aumento relativo della produzione di queste due citochine dopo stimolazione con LPS, il risultato è significativamente ribaltato, ovvero più alto in questi ultimi. Queste osservazioni suggeriscono un ruolo nella patogenesi delle IPF a queste due citochine, il che sarebbe in linea con il ruolo che viene loro attribuito anche nelle febbri ricorrenti con mutazione nota. Una possibilità è che più alti livelli di produzione basale delle due citochine in soggetti 423P possano indurre una relativa desensibilizzazione dei rispettivi recettori; quest'ultimo è un meccanismo ben conosciuto, in grado di prevenire i deleteri effetti che verrebbero a manifestarsi con una persistente stimolazione citochinica. La conseguenza è che i portatori della variante 423Q potrebbero essere molto più sensibili all'aumento della secrezione di TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e quindi più proni allo stadio pro-infiammatorio, nonché allo sviluppo di febbre periodica rispetto ai portatori 423P.

XIAP è una delle molecole chiave nell'inibizione di caspasi-9 e -3, e quindi del segnale apoptotico, tuttavia molti studi hanno dimostrato che XIAP è in grado di partecipare attivamente nelle trasduzioni del segnale che coinvolgono NF- $\kappa$ B e le MAP kinasi, oltre che inibire la cascata del segnale di JNK, modulando così molte molecole coinvolte nell'infiammazione: il TNF- $\alpha$  sul versante pro-infiammatorio e il TGF $\beta$  su quello anti-infiammatorio.

XIAP verrebbe quindi a regolare l'infiammazione in due modi differenti: da una parte, controllando l'apoptosi delle cellule infiammatorie e, quindi, lo spegnimento della risposta infiammatoria. Dall'altra, controllando l'attivazione delle cellule infiammatorie agendo sull'attivazione di NF- $\kappa$ B.



E' risaputo inoltre che, similmente a XIAP, anche il TNF- $\alpha$  esercita un duplice ruolo sull'apoptosi e sull'attivazione delle cellule infiammatorie, controllando due differenti cascate del segnale: la prima dipendente da FADD e che porta all'attivazione della cascata delle caspasi e la seconda dipendente dal reclutamento di TRADD con conseguente attivazione di NF-kB. Così come per le TRAPS, tali attività possono essere associate allo sviluppo delle IPF, in cui lo sviluppo può essere attribuito alla difettiva produzione del recettore in forma solubile anti-infiammatoria e alla difettiva apoptosi mediata dal recettore. Potrebbe altresì essere plausibile che le variazioni nell'espressione di XIAP possano influenzare la risposta cellulare al TNF- $\alpha$  alterando il normale equilibrio fra i due segnali del recettore, FADD oppure TRADD mediati.

In conclusione questo lavoro dimostra che l'aumentata espressione di XIAP associata ad una comune variazione nel gene BIRC4 è in grado di favorire lo sviluppo di malattie autoinfiammatorie probabilmente modulando la secrezione di citochine infiammatorie.

## 8. XIAP E ALPS

### 8.1 *Xiap e linfoproliferazione.*

L'omeostasi del sistema immunitario è garantita dal bilanciamento fra l'attivazione e proliferazione dei linfociti, e l'eliminazione tramite apoptosi dei linfociti effettori [164,165]. Alterazioni a carico di questo sistema di equilibrio possono portare allo sviluppo di malattie linfoproliferative con accumulo non clonale di linfociti negli organi linfoidi secondari.

La sindrome linfoproliferativa legata all'X (XLP) e la sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) sono sindromi che possono essere ascritte rispettivamente ad un eccesso di proliferazione e ad un forte difetto apoptotico della componente immunitaria. La XLP è dovuta ad una diminuzione dell'efficienza della citotossicità cellulo-mediata, e causa l'incapacità del sistema immunitario di controllare le infezioni da EBV [166-168], le quali portano allo sviluppo di un quadro linfoproliferativo. La malattia è generalmente causata da mutazioni che colpiscono il gene di SAP, molecola coinvolta nel *signaling* di 2B4, una molecola recettore per SLAM [169-171], in grado di stimolare la citotossicità mediata da CTL e cellule NK, coinvolta nello smaltimento di cellule infettate con EBV. La malattia è caratterizzata da infezioni EBV spesso fatali, anemia aplastica o disordine linfoistiocitico, frequentemente da ipogammaglobulinemia e dallo sviluppo di linfomi Hodgkins e non-Hodgkins nei pazienti di sesso maschile. Questi pazienti mostrano alterazioni nella citotossicità 2B4-mediata e l'assenza di cellule NKT [172,173], una peculiare popolazione di cellule T che esprimono una variante di TCR  $\alpha\beta$  (V $\alpha$ 24 e V $\beta$ 11), in grado di riconoscere glicosfingolipidi presentati dalla molecola CD1d.

E' stato recentemente riportato che 12 pazienti con sintomatologia analoga alla XLP, ma in cui era assente la mutazione nel gene di SAP, erano portatori di mutazioni a carico del gene BIRC4, codificante per XIAP [174]. Questi pazienti appartengono a tre famiglie e presentavano

infezione da EBV, linfoistiocitosi, epato e/o splenomegalia. Quattro di questi mostravano anche diagnosi di ipogammaglobulinemia. Nessuno di loro manifestava alterazioni a carico della citotossicità 2B4-mediata, ma tuttavia mostravano assenza di cellule NKT nel sangue periferico. Le mutazioni descritte a riguardo di questi pazienti inibivano la produzione di XIAP, incrementando così la risposta apoptotica dei linfociti a seguito di diversi stimoli.

Le malattie autoimmuni sono malattie complesse nel cui sviluppo concorrono diversi fattori tra cui vi è una componente genetica, con il possibile coinvolgimento di multiple alterazioni geniche. Per questa ragione le malattie autoimmuni sono dette oligogeniche. Anche la ALPS non presenta un quadro classico di malattia monogenica. La maggior parte dei pazienti descritti sono caratterizzati da una mutazione nel gene che codifica per il recettore Fas e rientrano nella categoria ALPS Ia. Tale mutazione determina la perdita di funzionalità di Fas, con conseguente difetto nello spegnimento della risposta immunitaria. La maggior parte dei pazienti con ALPS presenta la mutazione di Fas in eterozigosi. E' interessante notare che i genitori che portano la stessa mutazione sono generalmente sani. Questo suggerisce che altri fattori complementari, ambientali o genetici, ancora sconosciuti, possano favorire l'espressione della malattia.

Come già detto anche nei pazienti con DALD, si ha con un quadro clinico simile a quello ALPS, ma privo di espansione di linfociti T doppi negativi per CD4 e CD8.

Inoltre i linfociti T di molti di questi pazienti sono anche resistenti alla morte cellulare indotta da ceramide, un secondo messaggero che agisce a valle di Fas. Questi dati suggeriscono il coinvolgimento di mutazioni che colpiscono il sistema Fas a valle del recettore.

Come avviene nelle famiglie dei pazienti con ALPS, spesso entrambe i genitori sani dei pazienti con DALD presentano una diminuita funzionalità di Fas in vitro, il che suggerisce che il paziente abbia ereditato più alterazioni geniche, che contribuiscono allo sviluppo dello stato conclamato della malattia.

Un corollario di questo modello oligogenico è anche l'osservazione che alterazioni modeste della via di Fas, insufficienti allo sviluppo dell'ALPS, possono favorire lo sviluppo di altre

malattie autoimmuni con un quadro clinico meno severo. Questa possibilità sembra confermata da due osservazioni: i) dal fatto che le famiglie dei pazienti con DALD hanno un'aumentata frequenza di malattie autoimmuni comuni senza sviluppare il quadro ALPS; ii) un difetto nella funzionalità di Fas è stato trovato in quasi il 50% di pazienti con Sindrome Autoimmune Multipla (MAS), cioè pazienti provenienti da famiglie con più di un caso di autoimmunità entro il primo o secondo grado di parentela, e in circa il 30% di pazienti con diabete di Tipo I, Sclerosi Multipla o Tiroidite (come descritto nel primo capitolo dei risultati di questa tesi).

## 8.2 *Scopo.*

Visto il coinvolgimento di XIAP nello sviluppo delle XLP, inoltre visto il suo ruolo nel controllare l'apoptosi linfocitaria, ci siamo proposti di analizzare il gene BIRC4 in 55 pazienti con sintomi simili alla XLP, privi di mutazioni a carico del gene di SAP e abbiamo esteso l'analisi a 60 pazienti affetti da ALPS, ipotizzando che mutazioni di XIAP potessero in parte accumulare i due quadri.

### 8.3 *Materiali e Metodi.*

#### *Pazienti.*

Per lo studio sono stati reclutati 60 pazienti con sospetta sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) provenienti dall'Ospedale Regina Margherita di Torino e 55 pazienti con diagnosi di sindrome linfoproliferativa legata all'X (XLP), ma privi di mutazioni nel gene di SAP. Sono stati esclusi dall'analisi i pazienti affetti da sindrome di Down o Turner. I controlli di pari età per i soggetti pediatrici erano privi di sintomatologie autoimmuni o allergiche, ed hanno mostrato una funzionalità di Fas simile ai controlli adulti. Tutti i soggetti e i parenti dei minori hanno approvato lo studio con consenso informato.

#### *Mini-library su colonie batteriche.*

L'RNA messaggero è stato estratto ad linfociti T derivati da soggetti di controllo di sesso femminile, eterozigoti per il gene, utilizzando il kit NucleoSpin RNAII. 500 ng di mRNA totale sono stati poi retrotrascritti utilizzando il kit ThermoScript RT-PCR System. I prodotti di retrotrascrizioni sono stati quindi ligati in un vettore pGEM-T e trasformati in batteri JM109. Le colonie cresciute su terreno selettivo sono state quindi sottoposte a PCR ed i relativi prodotti sequenziati.

#### *Primer Extension.*

La Primer Extension (PE) é una reazione di estensione di un oligonucleotide con i ddNTPs, per opera di una particolare DNA-polimerasi chiamata Termosequenasi; tale tecnica viene solitamente applicata per individuare sequenze polimorfiche. Nella reazione viene utilizzato un solo primer che, appaiandosi al filamento di DNA, viene esteso con un singolo nucleotide in corrispondenza del sito polimorfico; al termine della reazione si ottengono due oligonucleotidi di

uguale lunghezza che differiscono per il didesossiribonucleotide finale; questa caratteristica permette la separazione mediante corsa cromatografica.

Si è pensato quindi di applicare il principio al nostro specifico caso disegnando un primer forward, XIAP-PE(F), ed uno reverse, XIAP-PE(R) in grado di ibridarsi a ridosso del punto di variazione del cDNA; l'estensione del primer avverrà con un ddNTPs differente a seconda che il campione in esame presenti o meno la porzione terminale dell'esone 3

I prodotti di reazione della *primer extension* vengono quindi analizzati tramite corsa cromatografica su DHPLC.

#### *Espressione e saggio di attività caspatica.*

Il saggio di attivazione delle caspasi-8, -9, -10 e -3 è stato condotto su linfociti T ottenuti da PBMC derivati da pazienti e controlli attivati con PHA al giorno T0 (1 µg/ml) e al giorno T8 (0,1 µg/ml) e coltivate in terreno RPMI 1640 completato con 10% di siero fetale bovino (FBS) e interleuchina-2 (IL-2) (10U/ml). Quattro giorni dopo la seconda stimolazione le cellule sono state incubate o no con anticorpo CH11 (2µg/ml) in ghiaccio per 30 minuti, quindi trasferite a 37°C per 3 ore per l'analisi delle caspasi-8 e -10, mentre sono state trattate con etoposide (5µg/ml) per 6 ore a 37°C per l'analisi delle caspasi-9 e -3. Allo scadere dell'incubazione le cellule sono state centrifugate e lisate, quindi l'estratto proteico è stato quantizzato tramite Biorad Protein Assay. Per ciascun test sono stati utilizzati 50µg di lisato totale, analizzati in doppio, corsi in parallelo con altrettanto campione derivato da soggetti di controllo FasS. I risultati sono stati espressi come attività caspatica relativa, ovvero: (attività della caspasi su cellule stimulate/ attività della caspasi su cellule non stimulate) x 100.

Il grado di espressione della caspasi-9 e di XIAP sono stati valutati tramite SDS-page e immunoblotting utilizzando 150 µg di lisato cellulare. Le membrane di nitrocellulosa sono state bloccate con TBS contenente 5% latte in polvere e 0,1% Tween-20, incubate per 16 ore con gli

anticorpi diretti verso la caspasi-9, XIAP e per la tubulina, quindi rilevati con anticorpo secondario coniugato con per ossidasi e analizzati in chemiluminescenza. Le bande ottenute sulle lastre sono state quantizzate con il GelDoc EQ system.

*Costruzione e trasfezione dei costrutti.*

Per la costruzione dei vettori contenenti le varianti di XIAP mutate, abbiamo amplificato la porzione del cDNA contenente le rispettive variazioni utilizzando oligonucleotidi contenenti appositi siti di restrizione, compatibili con la sequenza genica. I frammenti ottenuti dall'amplificazione sono stati quindi digeriti con enzimi di restrizione opportuni, così come anche il vettore pEGFP. A seguito della digestione i frammenti ed il vettore sono stati purificati e utilizzati come componenti per una reazione ligasica, quindi trasformati in batteri JM109. Le colonie cresciute su terreno selettivo sono state quindi analizzate tramite PCR e sequenziamento per verificare il corretto inserimento dei frammenti nel vettore, in accordo con la cornice di lettura per la corretta trascrizione e traduzione delle proteine di fusione con la GFP (green fluorescent protein). I costrutti così ottenuti sono stati amplificati e utilizzati per trasfettare cellule HeLa tramite incubazione con lipofectamina.

Abbiamo proceduto in maniera analoga per la creazione e la trasfezione dei vettori contenenti la forme *wild-type* e mutata di Fas, utilizzando in questo caso il vettore pcNEO (+) che permette di ottenere proteine di fusione con un particolare peptide *tag*, il FLAG, utilizzato poi come antigene per identificare le proteine trasfettate in western blot.

#### 8.4 Risultati.

##### *Pazienti.*

Abbiamo sequenziato il gene di XIAP, a partire da DNA genomico, in 60 pazienti classificati come ALPS e in 55 pazienti con un quadro clinico simile a quello della XLP, ma privi di mutazioni nel gene causale di SAP. Abbiamo riscontrato variazioni geniche in due pazienti appartenenti al primo gruppo (Pt1 e Pt2) e in uno solo del secondo gruppo (Pt3). Ampliamo l'analisi genetica di questi 3 pazienti sequenziando in geni codificanti per Fas, caspasi-8, caspasi-10 e SAP, riscontrando che il soggetto 1 è anche portatore di una mutazione a carico del gene di Fas, mentre non sono state trovate alterazioni nei soggetti Pt2 e Pt3.

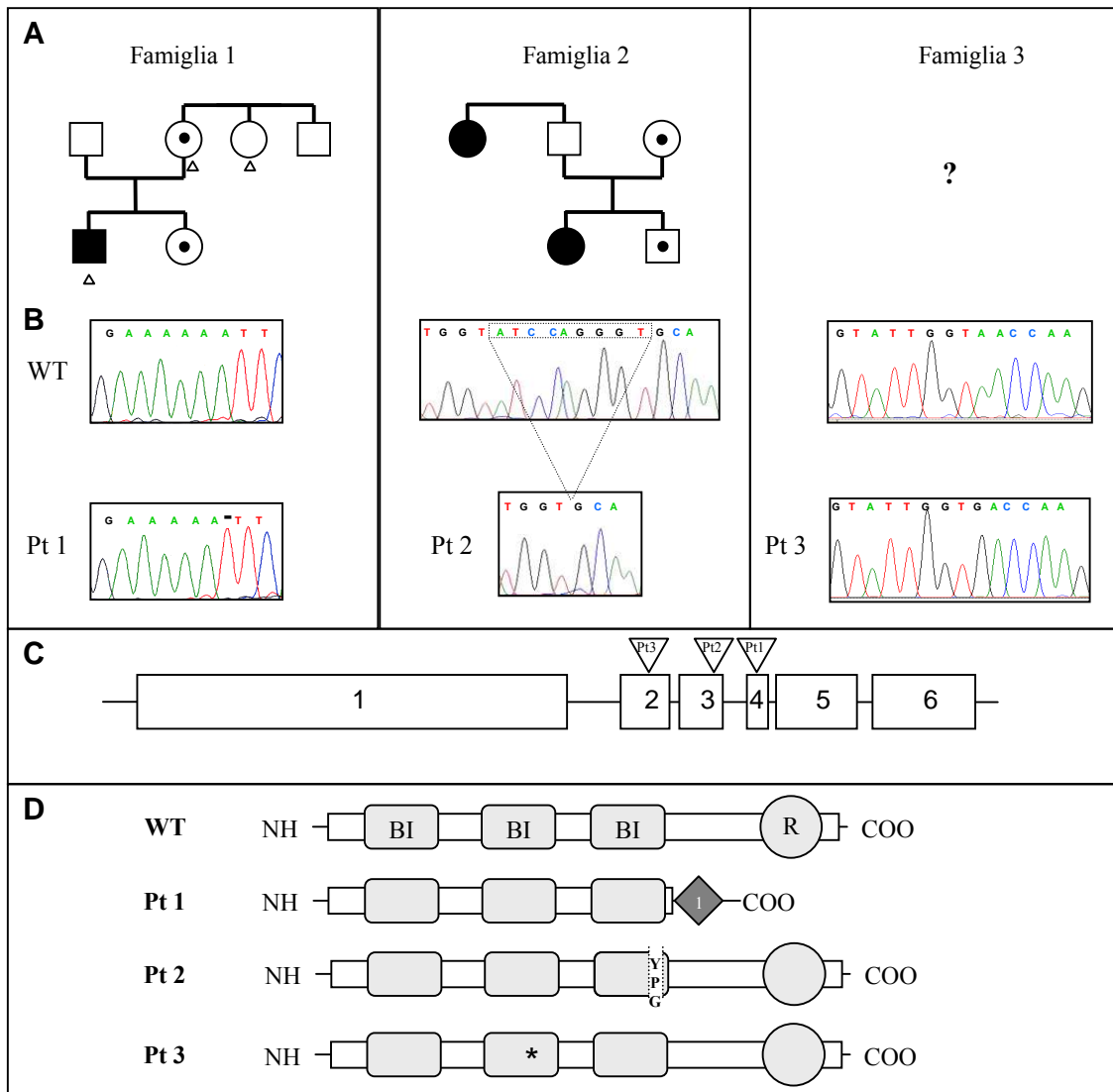
Il Paziente 1 ha sviluppato, all'età di 6 mesi, una persistente trombocitopenia, linfadenomegalia e splenomegalia, nonché autoimmunità ematologiche (anemia, neutropenia) e artrite. Il paziente ha inoltre manifestato spesso episodi di febbre simil-settica, in assenza di segni di infezione da EBV, e la presenza di anticorpi anti-nucleo e anti-fosfolipidi. Entrambe i genitori e la sorella sono sani. Il paziente è portatore di una mutazione a carico del gene Fas in eterozigosi, la funzionalità del sistema di Fas è risultata *borderline* al limite della norma e la percentuale di linfociti T DN nel sangue periferico risulta nella norma. La mutazione nel gene di Fas è una sostituzione, 755G/A, nell'esone 7 che si traduce in un sostituzione aminoacidica (E178K) nel dominio intracellulare del recettore, prima del *death domain*. L'analisi condotta sui familiari ha evidenziato che la mutazione è stata ereditata dalla madre, anch'essa eterozigote. La funzionalità di Fas risultava normale nella madre, ma difettiva nel padre.

La Paziente 2 ha sviluppato, all'età di 8 mesi, linfadenopatia persistente, epatosplenomegalia, anemia, ipergammaglobulinemia e anticorpi anti-nucleo e anti-fosfolipidi. Anche per questo paziente sono stati riscontrati episodi di febbre simil-settica, in assenza di segni di infezione da EBV. La funzionalità del sistema Fas si è rivelata deficitaria, ma la



percentuale di linfociti T DN nel sangue periferico risultava nella norma. Entrambi i familiari ed il fratello sono sani, ma manifestano tutti il difetto funzionale del sistema Fas

Il paziente 3 ha sviluppato all'età di sei anni una severa infezione primaria da EBV con febbre persistente e sviluppo di epatosplenomegalia, ma in assenza anticorpi EBNA. Durante il *follow up* di due anni è stato ricoverato tre volte con un quadro di sistesi emofagocitica, febbre alta, anemia, leuco e trombocitopenia. Dopo l'infezione primaria da EBV, il paziente ha manifestato ipogammaglobulinemia, lentamente recuperata, ma con il persistere di bassi livelli di IgG, IgM e IgA, per un periodo di almeno 10 anni. Su questo paziente non sono stati condotti gli studi funzionali del sistema Fas, poiché non è stato possibile recuperare campioni di materiale fresco, così come non sono disponibili i dati sui familiari. In **Figura 10** sono riportati gli alberi genealogici dei pazienti (non è stato possibile risalire all'ereditarietà della mutazione del paziente 3), gli elettroferogrammi della variazioni geniche e i modelli esplicativi delle proteine prodotte a seguito delle mutazioni.



**Figura 10.** Identificazione delle mutazioni nel gene di XIAP in pazienti con linfoproliferazione e loro familiari. (A): alberi genealogici delle famiglie in esame. I cerchi rappresentano le femmine, i quadrati i maschi. I box neri rappresentano i pazienti affetti, i box bianchi con il punto nero gli individui portatori delle mutazioni. Le frecce indicano i membri della famiglia portatori della mutazione in Fas. (B): elettroferogrammi delle variazioni geniche rispetto a quello *wild-type*. (C): rappresentazione generale degli esoni/introni del gene di XIAP; le frecce rappresentano il sito colpito dalle mutazioni. (D): rappresentazione schematica della proteina XIAP e delle rispettive forme mutate.

### *Variazioni del gene di XIAP.*

Il Paziente 1 è risultato portatore della delezione di una base (in posizione 1189 del cDNA) che causa lo slittamento della cornice di lettura, portando alla traduzione di 17 nuovi aminoacidi, con la successiva comparsa di un codone di STOP precoce. La mutazione è stata ipotizzata portare all'espressione di una forma troncata della proteina, del peso di circa 35KDa, in grado di mantenere i soli domini BIR, ma mancante del domino RING. La mutazione, ereditata dalla madre, non è stata riscontrata in 100 soggetti sani di controllo.

La Paziente 2 non mostra alcuna alterazione a livello del gene di XIAP, ma, analizzando il suo cDNA abbiamo riscontrato la presenza di una forma atipica (in concomitanza con la presenza della forma normale), contenente la delezione di 9 paia di basi (969-977) al termine dell'esone 3. La delezione produce una proteina in cui risultano assenti tre aminoacidi (YPG) altamente conservati del dominio BIR3. La forma atipica è stata ritrovata sia nella madre che nel fratello, ma non nel padre. L'analisi dell'intero introne situato fra l'esone 3 e 4 del gene non ha rivelato nessuna alterazione in nessuno dei soggetti analizzati. Al fine di valutare se questa particolare forma atipica di RNA fosse presente anche nella popolazione generale, abbiamo sequenziato 14 colonie indipendenti, scelte da *mini-library* prodotte dal cDNA codificante per XIAP, della paziente e dei familiari, di 22 altri pazienti con sintomi simili ad ALPS, di 16 familiari di questi ultimi e di 23 donatori sani di controllo. I risultati hanno dimostrato che solo la Pt2, la madre e il fratello manifestano una sostanziale percentuale di colonie in cui era presente la forma atipica (rispettivamente 57%, 36% e 36%) (dati non mostrati). Solo una colonia positiva è stata riscontrata anche in 4 altri pazienti (Pazienti A, B, C, e D), due familiari (Familiare E ed F) ed un controllo sano (Controllo atipico). Questi dati suggeriscono, quindi, che la forma atipica, priva di 9 basi, può essere prodotta in basse quantità anche nella popolazione generale. Per quantificare più precisamente questo fenomeno abbiamo analizzato tutti i soggetti portatori della forma atipica e 10 controlli, tramite la tecnica della *primer extension* seguita dall'analisi al DHPLC. I risultati hanno dimostrato che solo la paziente 2, la

madre ed il fratello mostrano un sostanziale ammontare della forma atipica (57, 44 e 60% del cDNA totale codificante per XIAP), mentre tutti gli altri soggetti mostrano livelli appena apprezzabili della forma atipica (**Tabella 8**).

Quest'ultimo dato rinforza l'ipotesi che l'alto ammontare della forma atipica rappresenta un tratto particolare della famiglia del paziente 2.

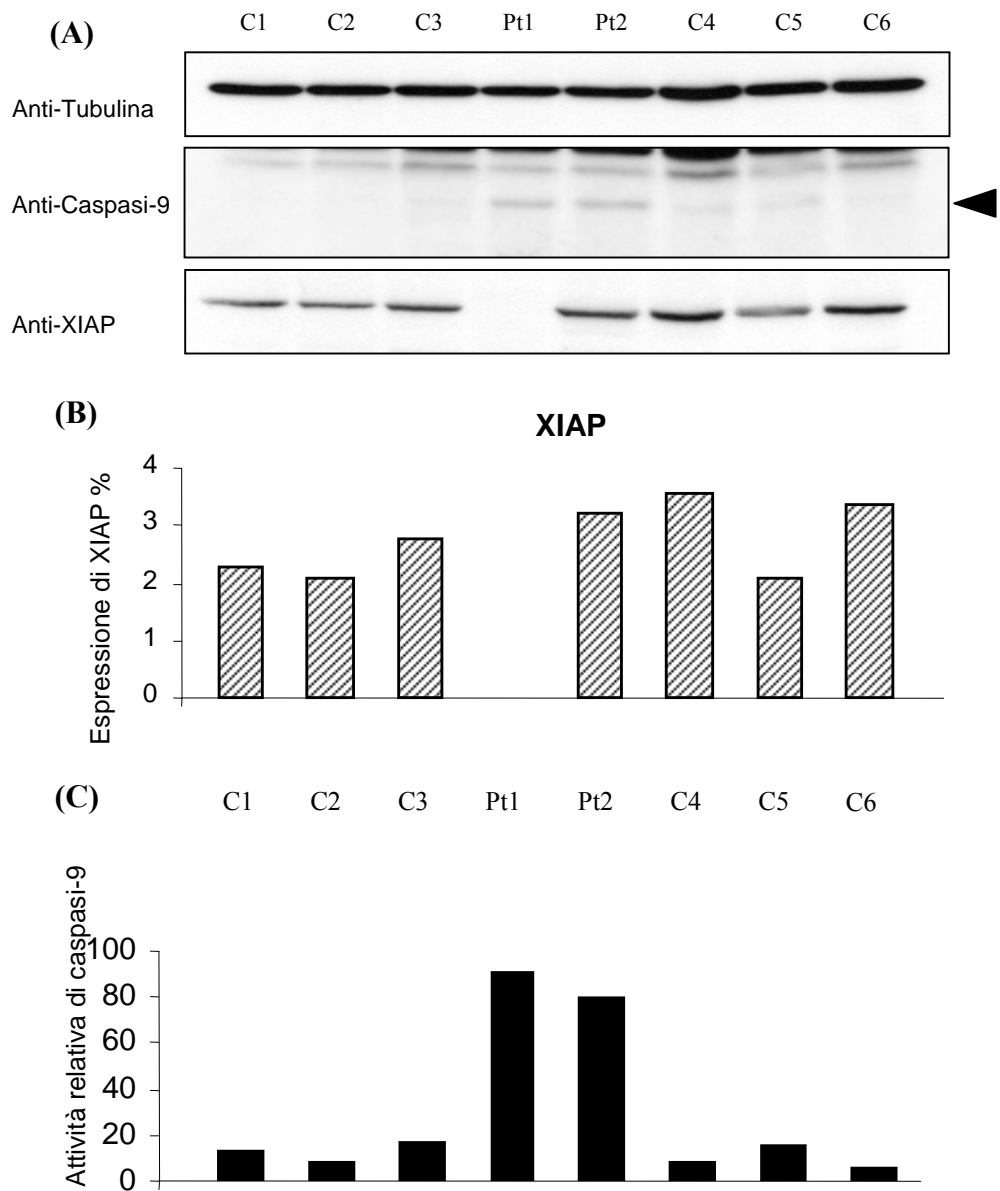
<i>Campione</i>	<i>F(%)</i>
Paziente A	<5
Paziente B	<5
Paziente C	<5
Paziente D	<5
Controllo atipico	<5
<b>Madre</b>	<b>44.0</b>
<b>Fratello</b>	<b>60.2</b>
<b>Paziente 2</b>	<b>57.2</b>
Familiare E	<5
Familiare F	<5
Controllo1	<5
Controllo2	<5
Controllo3	<5
Controllo4	<5
Controllo5	<5
Controllo6	<5
Controllo7	<5
Controllo8	<5
Controllo9	<5
Controllo10	<5

**Tabella 8.** Percentuali della frequenza della forma atipica nella popolazione presa in esame tramite lo studio con *primer extension* e corsa elettroforetica con DHPLC. Le frequenze rappresentano la percentuale della forma atipica rispetto alla quantità di RNA messaggero totale analizzato.

Il Paziente 3 è portatore di una sostituzione (586G>A) nell'esone 2 del gene, la quale si traduce in una variazione aminoacidica (D196N) a livello del dominio BIR2 della proteina. Non abbiamo potuto valutare l'ereditarietà della mutazione poiché non sono stati disponibili prelievi appartenenti ai genitori. La mutazione non è stata ritrovata nella popolazione dei controlli sani (n=100).

*Analisi funzionale e di espressione sui linfociti dei pazienti.*

Per verificare se le variazioni riscontrate nei nostri pazienti potessero influenzare l'espressione e la funzionalità di XIAP, abbiamo valutato i suoi livelli di espressione tramite western blot e il grado di attivazione della caspasi-9, direttamente inibita da XIAP, su cellule a seguito di stimolazione con etoposide, sui linfociti derivati dai Pazienti 1 e 2. Non abbiamo potuto condurre nessun test funzionale sul Paziente 3, poiché non è pervenuto presso di noi nessun materiale fresco del Paziente. I risultati hanno dimostrato che l'espressione di XIAP risulta essere fortemente ridotta nel Paziente 1, mentre sono mediamente ridotta nella Paziente 2, tuttavia la funzionalità della caspasi-9 risulta essere aumentata in entrambe i soggetti, sintomo di una alterata capacità inibitoria di XIAP (**Figura 11**).



**Figura 11.** Analisi dell'espressione e della funzionalità di XIAP nei soggetti portatori delle mutazioni. (A): Western blot condotto sui lisati totali di PBMC derivati dai pazienti 1 e 2, sviluppato utilizzando anticorpi diretti verso XIAP, caspasi-9 e tubulina. La freccia nera indica la forma attiva della caspasi-9. (B): Analisi densitometrica dei western blot. I dati sono espressi in percentuale relativa al segnale della tubulina di ciascun soggetto. (C): analisi dell'attività di caspasi-9 dopo stimolazione con etoposide (6h). I dati sono riportati come attività relativa della caspasi-9 dopo stimolo, rispetto alle stesse cellule non stimolate.

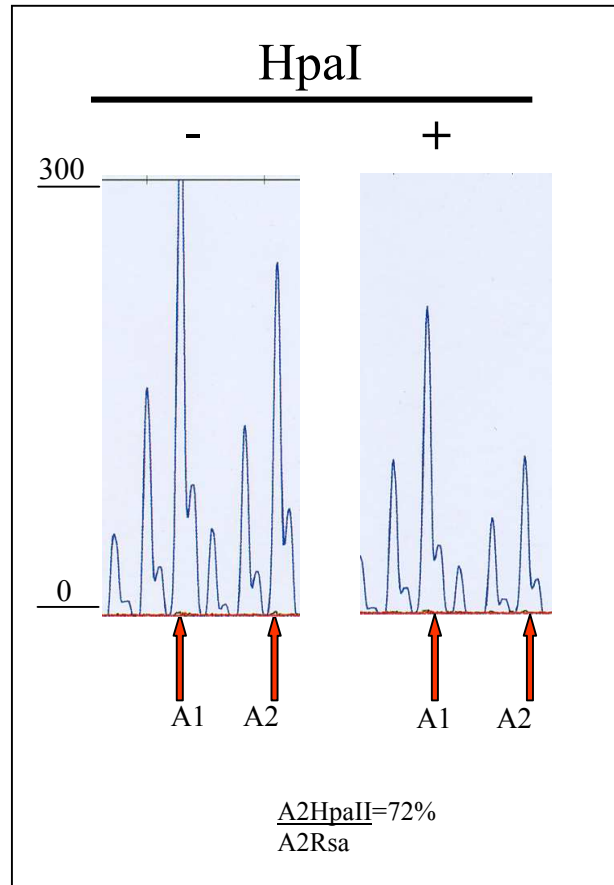
In un recente lavoro è stato dimostrato che alcune variazioni di XIAP possono influenzare la corretta maturazione delle cellule NKT, nonché la casuale inattivazione del cromosoma X. Per questa ragione ci siamo proposti di i) analizzare la distribuzione di particolari sottopopolazioni cellulari nei campioni di sangue periferico dei due pazienti e delle rispettive madri e ii) l'inattivazione del cromosoma X nella paziente 2. Questa analisi ha permesso di individuare nel Paziente 1, ma non nella Paziente 2 e nelle rispettive madri una ridotta percentuale di cellule NKT, (**Tabella 9**) caratterizzate dall'espressione in superficie dei marcatori CD3<sup>+</sup> e TCR $\alpha$ 24 $\beta$ 11<sup>+</sup>. Oltre a questo, entrambe i pazienti e le madri mostrano una minor percentuale di cellule NK (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>), mentre non sono state riscontrate differenze significative, rispetto alla popolazione di controllo, riguardo alla distribuzione di linfociti T helper (CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>), T citotossici (CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>) e linfociti B (CD19<sup>+</sup>)(**Tabella 9**).

**Tabella 9.** Distribuzione delle sottopopolazioni linfocitarie in campioni di sangue periferico dei pazienti 1 e 2 e delle rispettive madri.

	controlli	Paziente 1	Madre Pt.1	Paziente 2	Madre Pt.2
<b>Cellule NKT (CD3<sup>+</sup>TCR<math>\alpha</math>24<math>\beta</math>11<sup>+</sup>)</b>	<b>0,08<sup>a</sup>(0,04-0,22)</b>	<b>0,01*</b>	<b>0,09</b>	<b>0,13</b>	<b>0,04</b>
<b>Cellule NK (CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>)</b>	<b>8,70(5,48-14,98)</b>	<b>1,40*</b>	<b>2,64*</b>	<b>2,21*</b>	<b>2,44*</b>
<b>Linfociti T helper CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup></b>	<b>66,75(57,67-78,09)</b>	<b>56,25</b>	<b>62,77</b>	<b>64,37</b>	<b>75,53</b>
<b>Linfociti T citotossici (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)</b>	<b>31,91(20,33-37,65)</b>	<b>41,52</b>	<b>36,10</b>	<b>33,76</b>	<b>21,80</b>
<b>Linfociti B (CD19<sup>+</sup>)</b>	<b>8,32 (4,39-16,35)</b>	<b>19,49</b>	<b>12,70</b>	<b>18,75</b>	<b>8,60</b>

a: mediana derivata dall'analisi della popolazione di controllo, fra parentesi sono indicati il 5° ed il 95° percentile. I numeri indicano la proporzione di cellule positive (%).

L'analisi riguardante l'inattivazione del cromosoma X nella Paziente 2 ha mostrato che tale fenomeno non risulta essere totalmente casuale (**Figura 12**).



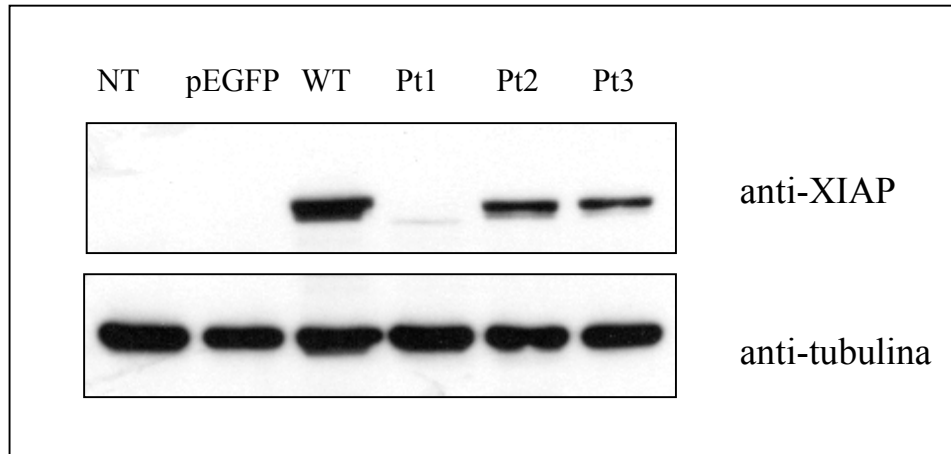
**Figura 12.** Analisi dell'inattivazione dell'X nella Paziente 2.

*Analisi su cellule trasfettate.*

Per determinare l'effetto funzionale delle variazioni di XIAP in esame, abbiamo clonato i cDNA codificanti per la proteina *wild-type* e le forme di mutazione di tutti e tre i pazienti in un vettore di espressione eucariota (pEGFP), ottenendo le seguenti proteine di fusione con la GFP: GFP-XIAP<sup>WT</sup>, GFP-XIAP<sup>X17</sup>, GFP-XIAP<sup>Δ3</sup> e GFP-XIAP<sup>D196N</sup>. Tutti i costrutti sono stati utilizzati per trasfettare cellule HeLa; queste sono state quindi lisate 24 ore dopo la trasfezione ed i lisati totali analizzati tramite Western Blot. Dall'analisi abbiamo evidenziate che solo la



forma *wild-type* viene espressa a livelli apprezzabili, mentre tutte e tre le forme derivate dai pazienti mostrano un difetto di espressione, a dimostrazione del fatto che tutte e tre i tipi di variazione hanno influenza sull'espressione della proteina (**Figura 13**).

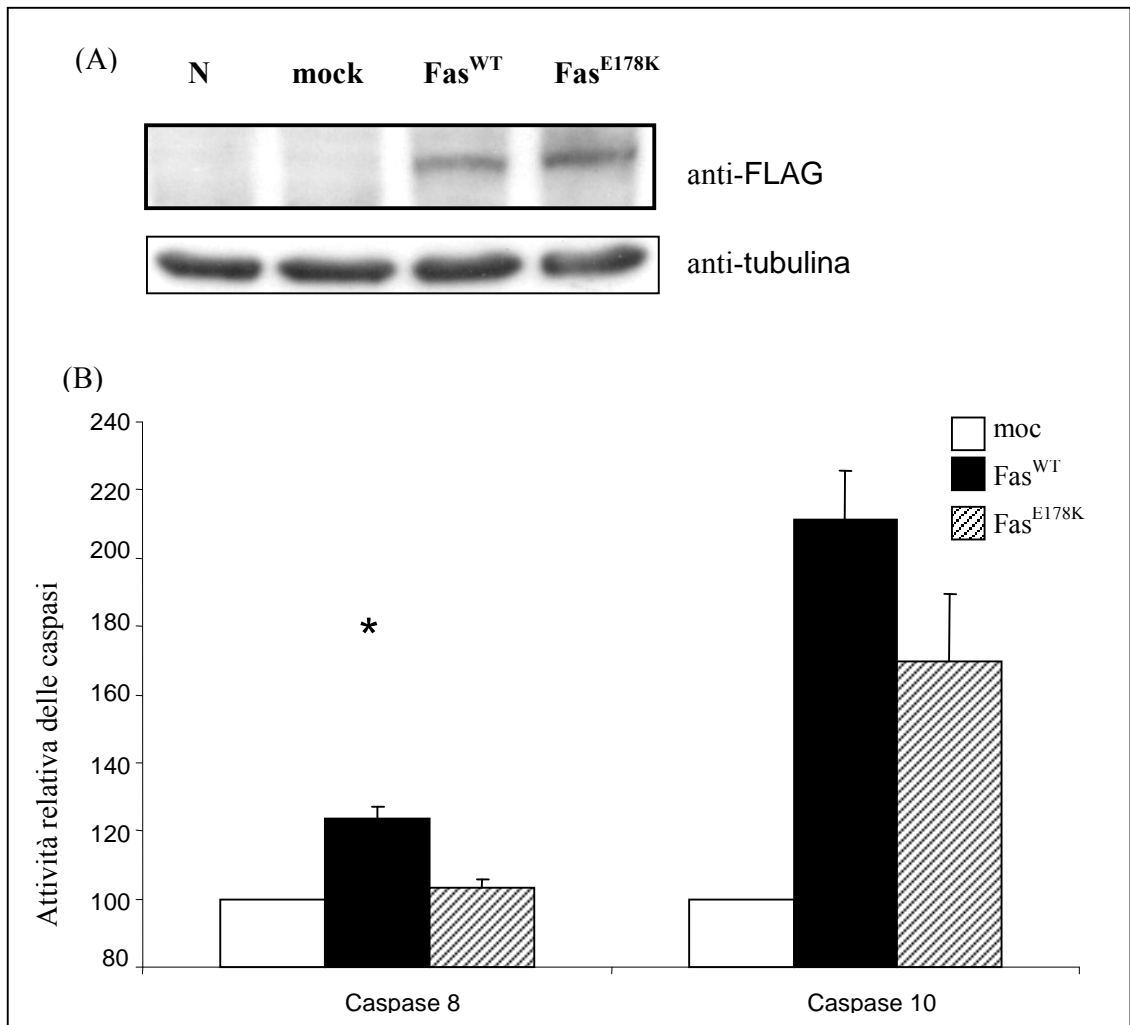


**Figura 13.** Espressione di XIAP nei lisati derivati da cellule 293T trasfettate con i diversi vettori: GFP, GFP-XIAP<sup>WT</sup>, GFP-XIAP<sup>X17</sup>, GFP-XIAP<sup>Δ3</sup> e GFP-XIAP<sup>D196N</sup>. Il western è stato sviluppato utilizzando un anticorpo monoclonale diretto verso XIAP e verso la tubulina.

Questi dati suggeriscono che la mutazione D196N è in grado di alterare la capacità di XIAP di inibire la caspasi-3, ma non quella della caspasi-9, il che risulta essere in linea con la localizzazione della mutazione nel dominio BIR2; dominio che è noto essere implicato nell'inibizione della caspasi-3.

Come già descritto, il paziente 1 è portatore di una seconda mutazione, a carico del gene codificante per Fas. Per verificare se le alterazioni da noi riscontrate possano o no essere dovute alla collaborazione di entrambe le variazioni (XIAP e Fas), abbiamo valutato l'effetto funzionale della mutazione di Fas trasfettando cellule 293T con due costrutti, codificanti rispettivamente per la forma *wild-type* e per quella mutata. Un vettore pEGFP è stato co-trasfettato assieme ai due costrutti per meglio individuare le cellule trasfettate. Ventiquattro ore dopo la trasfezione abbiamo valutato la proporzione di cellule morte tramite citofluorimetria, dopo averle colorate

con propidio ioduro le cellule sono state colorate. I lisati totali ottenuti dalle stesse cellule trasfettate sono stati poi utilizzati per analizzare il grado di attivazione delle caspasi-8 e -10. I dati ottenuti hanno dimostrato che entrambe le forme di Fas sono in grado di indurre uguale grado di mortalità cellulare e di attivare in ugual maniera la caspasi-10. Tuttavia, le cellule trasfettate con la forma mutata di Fas, manifestano un più bassa attivazione della caspasi-8 ( $p < 0.01$ ) (**Figura 14**).



**Figura 14.** Espressione di Fas e funzionalità del sistema Fas-mediato su cellule 293T trasfettate con la forma *wild-type* e la forma mutata del paziente 1. (A): analisi tramite western blot condotto su lisati totali derivati dalle cellule trasfettate con le due forme di Fas e sviluppato utilizzando anticorpi diretti verso il *tag* FLAG e verso la tubulina. (B): analisi dell'attività della caspasi-8 e -10 valutata dopo 24 ore di trasfezione. I dati sono espressi in percentuale relativamente al controllo trasfettato con il vettore vuoto (posto uguale a 100%) e rappresentano le medie e le deviazioni standard fra 4 esperimenti indipendenti. L'asterisco indica i dati statisticamente significativi rispetto ai dati ottenuti trasfettando la forma *wild-type*.

## 8.5 *Discussione.*

La deregolazione del processo apoptotico è implicata nella patogenesi di varie malattie umane. Patologie linfoproliferative benigne, spesso in combinazione con sintomi autoimmuni, sono state associate ad alterazioni di Fas, FasLigando o Caspasi-10. L'identificazione di mutazioni nei geni apoptotici ha contribuito a capire il significato fisiologico delle molecole coinvolte, spesso è stato un utile strumento di diagnosi potrà offrire una ulteriore bersaglio per la cura delle malattie stesse.

Il gruppo di pazienti analizzato in questo studio mostrava caratteristiche cliniche riconducibili ad ALPS, ma mancava dell'espansione clonale dei linfociti T DN.

I dati riferiti al modello murino confermano che un quadro simil-ALPS può essere causato da alterazioni genetiche coinvolgenti il sistema di Fas, ma mostrano che potrebbe essere anche causato da alterazioni in altri sistemi coinvolti nell'apoptosi o nella proliferazione linfocitaria, tra questi si possono ricordare difetti nella via estrinseca di Fas (c-FLIP,FADD,CASP8), nella via mitocondriale (Bcl-2, Bax, Xiap), nelle vie differenziative linfocitarie ( CTLA-4, ICOS, PD-1) e in chinasi o fosfatasi capaci di regolare l'attivazione del linfocita.

All'origine della malattia potrebbero esserci difetti a livello di geni con attività pro-apoptotica oppure anti-apoptotica; il nostro interesse si è focalizzato sul gene "X-linked" XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein), il cui possibile ruolo nello sviluppo dell'ALPS era suggerito dalla letteratura e dall'osservazione che la DALD sembra essere più frequente nei maschi. Poiché XIAP è un inibitore delle caspasi, coinvolte nel processo apoptotico, si poteva ipotizzare che il quadro ALPS potesse essere dovuto ad alterazioni geniche capaci di esaltare l'attività inibitoria di XIAP. Questa ipotesi di lavoro è stata del tutto sovvertita dai risultati che hanno evidenziato nell'analisi del Paziente 1 una mutazione che inibisce, anziché attivare, la funzione di XIAP. Infatti la mutazione è un delezione in posizione 1189 del cDNA che crea uno slittamento nella cornice di lettura, portando alla formazione di una proteina tronca a livello del "linker" tra il dominio BIR3 e il dominio RING; dal punto mutato tale mutazione aggiunge 17

nuovi aminoacidi responsabili di una degradazione precoce della molecola, i cui livelli sono risultati non valutabili nel paziente emizigote.

Il Paziente 1 è tuttavia un caso atipico di ALPS/DALD poiché presentava un quadro clinico con linfadenopatia, splenomegalia e autoimmunità, ma presentava una morte cellulare indotta da Fas normale, o addirittura aumentata. Questo dato è in linea con i ridotti livelli di XIAP e suggerisce che in questo paziente il difetto genetico possa indurre il quadro linfoproliferativo agendo a livelli diversi dall'apoptosi. Questa possibilità è anche suggerita da un'altra particolarità della malattia presentata dal Paziente 1, ovvero lo sviluppo di ricorrenti attacchi febbrili simil-settici, un quadro che ricorda sindromi autoinfiammatorie, legate a alterazioni geniche a livello del TNFR1( Tumor Necrosis Factor Receptor1), appartenente alla stessa famiglia di Fas, o di trasduttori citoplasmatici coinvolti nell'attivazione di cellule infiammatorie. Per analogia si può ipotizzare che anche l'alterazione di XIAP possa avere un effetto nell'attivazione, piuttosto che nell'inattivazione delle cellule immunitarie. In questo senso è interessante notare che le caspasi sono oggi messe in relazione non solo con l'apoptosi, ma anche con l'attivazione e la proliferazione cellulare; infatti pazienti portatori di mutazioni che spengono la caspasi-8 sviluppano immunodeficienza, e la inibizione in vitro della stessa caspasi inibisce l'attivazione linfocitaria. Inoltre XIAP è stato esso stesso messo in relazione con l'ingresso in ciclo delle cellule, attraverso un'azione sulle cicline e sul fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B. E' anche interessante notare che XIAP è dotata, grazie al dominio RING, di attività E3-ligasica che le conferisce la capacità di ubiquitinare se stessa e altri substrati; questo sembra essere rilevante dal momento che è stato recentemente proposto che E3 ligasi siano coinvolte nella induzione di anergia nei linfociti T, un processo fondamentale per l'induzione della tolleranza periferica.

A suffragare l'ipotesi che XIAP possa svolgere un ruolo come fattore predisponente per la patogenesi di ALPS, abbiamo individuato in un secondo paziente una elevata produzione di una forma atipica della proteina. I nostri dati hanno mostrato che benché la forma atipica di mRNA di XIAP venga normalmente prodotta, seppure con una bassa frequenza nella popolazione, nella

Paziente 2, nella madre e nel fratello è invece prodotta con una frequenza significativamente più elevata (rispettivamente 57%, 44% e 60%) rispetto alla popolazione normale. E' possibile ipotizzare che l'elevata produzione in questa paziente abbia quindi basi ereditarie e possa avere un ruolo nello sviluppo della malattia. Il fatto che entrambi questi familiari siano sani suggerisce che la presenza della forma deleta dell'mRNA non sarebbe comunque sufficiente a determinare la comparsa della malattia, la cui manifestazione clinica potrebbe essere condizionata da altri fattori genetici o ambientali. Infine è degno di nota che, anche questa paziente, come il Paziente 1 portatore della mutazione, presentava un ricorrente sviluppo di febbri simil-settiche, manifestazione del tutto atipica nell'ALPS.

Mentre nel Paziente 1 è stato possibile individuare una seconda mutazione, nel gene di Fas, non abbiamo rivelato alcuna mutazione negli altri geni da noi studiati, nella Paziente 2. A tale proposito, mentre è possibile indicare come causa della malattia, un possibile effetto sinergico delle due mutazioni del Paziente 1, per quanto concerne la Paziente 2 è possibile solo ipotizzare una mutazione in un gene non noto, oppure un *background* oligogenico molto più predisponente verso lo sviluppo della malattia, oltre ad un eventuale contributo dei fattori ambientali.

L'analisi in Western Blot effettuata sui PBMC della Paziente 2 mostrava livelli normali di XIAP. Resta ancora da chiarire il meccanismo che sta alla base della produzione dello XIAP atipico.

La mutazione del Paziente 1 e quella della Paziente 2 hanno un aspetto comune: a livello cellulare, le rispettive proteine vengono espresse in modo ridotto rispetto allo XIAP *wild-type*. Nel primo caso i responsabili della degradazione precoce sembrano essere i 17 aa inseriti dal *frameshift* causato dalla mutazione. La variazione nella sequenza aminoacidica introduce probabilmente un segnale di degradazione della proteina alterata. Nel secondo caso la perdita di tre amminoacidi alla fine del BIR3 sembra destabilizzare la proteina mutata: viene infatti persa una Prolina che è molto conservata in tutte le IAP e questo crea probabilmente dei problemi nella struttura terziaria della molecola. Ne sono conferma i dati ottenuti riguardo al grado di

attivazione della caspasi-9 nei rispettivi soggetti mutati. Le forme di XIAP mutato nei due pazienti correlano infatti con una aumentata attività della caspasi-9, substrato per eccellenza di inibizione da parte di XIAP, indicando quindi un conseguente difetto nella funzionalità della molecola.

Dati recentemente pubblicati hanno dimostrato che la XLP può essere causata non solo da mutazioni nel gene di SAP, ma anche da mutazioni nel gene codificante per XIAP. L'analisi genetica condotta sulla popolazioni di soggetti affetti da XLP, prive di mutazioni in SAP, in nostro possesso, ha individuato un paziente, il Paziente 3, portatore di una mutazione nel gene di XIAP. Pur non avendo a disposizione materiale fresco del Paziente 3, su cui condurre gli esperimenti relativi all'espressione ed alla funzionalità della proteina, siamo riusciti a clonare e trasfettare la forma mutata di XIAP in cellule HeLa. Al pari delle forme mutate caratterizzate per i pazienti 1 e 2, anche la mutazione del Paziente 3 è in grado di alterare l'espressione di XIAP e la sua funzionalità nell'inibire caspasi-9.

Questo dato riesce quindi a mettere in relazione le due malattie, ALPS e XLP, almeno dal punto di vista di un comune fattore predisponente, quale può essere la mancanza di espressione di una molecola come XIAP, non solo importante dal punto di vista del segnale apoptotico, ma anche largamente implicato in molti *pathways* importanti per la sopravvivenza e la proliferazione cellulare. Oltre a questo, XIAP è stato chiamato in causa come molecola importante nella sopravvivenza e/o nel differenziamento di cellule NKT; è stato infatti dimostrato che i pazienti con XLP portatori della mutazione di XIAP, mostrano un ridotto numero di cellule NKT presenti nel sangue periferico. Questa peculiarità risulta quindi un secondo punto in comune fra le due malattie; il paziente 1 infatti mostra un marcato difetto nella popolazione di cellule NKT circolanti nel sangue periferico.

Un ulteriore dato interessante è il fatto di aver riscontrato nei pazienti 1 e 2 e nelle rispettive madri un difettivo sviluppo delle cellule NK; il che suggerisce una nuova funzione di XIAP, che può quindi essere alterata quando questa proteina subisce un qualunque tipo di deregolazione.

A conclusione di questi dati possiamo quindi trovare una certa correlazione fra la sindrome autoimmune linfoproliferativa (ALPS) e la sindrome linfoproliferativa associata all'X (XLP); tale correlazione focalizza l'idea che alterazioni a carico di una proteina come XIAP, che svolge ruoli chiave nell'omeostasi del sistema immunitario regolando al contempo apoptosi e proliferazione, possono essere considerati fattori importanti per lo sviluppo di sindromi linfoproliferative.



## 9. BIBLIOGRAFIA

- 1) Goldsby R.A., Kindt T.J. and Osborne B.A. *Kuby Immunologia*. 2nda Edizione 2000.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Fisher GH, Rosemberg FJ, Straus SE, et al. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome., *Cell.*, 81:935-946, 1995.
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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.
- 8) Bettinardi A., Brugnani 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
- 9) Fleisher TA, Puck JM, et al. The autoimmune lymphoproliferative syndrome. A disorder of human lymphocyte apoptosis. *Clin Rev Allergy Immunol.*, 20(1):109-20, 2001
- 10) Jackson CE, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr Opin Pediatr.*, 11(6):521-527, 1999.
- 11) Choi Y, Ramnath VR, Eaton AS, et al. Expression in transgenic mice of dominant interfering Fas mutations: a model for human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol.*, 93(1):34-45, 1999.
- 12) Wang J, Zheng L, Lobito A, et al. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell.*, 98(1):47-58, 1999.
- 13) Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.*;267:1449-1456, 1995.

- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferations., *Blood.*, 89:2871-2879, 1997.
- 17) Dianzani U, Chiocchetti A, and Ramenghi U. Role of inherited defects decreasing Fas function in autoimmunity. *Life Sciences.*;72:2803-2824, 2003.
- 18) 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.
- 19) DeFranco S., Bonisconi S., Cerutti F., et al. Defective function of Fas in patients with type 1 diabetes associated with other autoimmune diseases. *Diabetes.*50(3):483-8, Mar 2001.
- 20) Comi C., Leone M., Bonisconi S., et al. Defective T cell Fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology.*;55(7):921-7, Oct 10 2000 .
- 21) Bona G., DeFranco S., Chiocchetti A., et al. Defective function of Fas in T cells from pediatric patients with autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol.*;133(3):430-7, Sept 2003.
- 22) P. H. Krammer, CD95's deadly mission in the immune system, *Nature* 407, 12, 2000.
- 23) Fu-Dong Shi, H. Gustaf, L. and N. Sarvetnik, Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction, *Trends in Immunology* 22, 2001.
- 24) E.M. Shevach, Regulatory T Cells in Autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 423-449, 2000.
- 25) Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol.*;10(5):581-7, Oct 1998.
- 26) Trapani JA, Sutton VR, Smyth MJ. CTL granules: evolution of vesicles essential for combating virus infections. *Immunol. Today.*;20(8):351-6, Aug 1999.
- 27) 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.
- 28) Ritchie A, Broxmeyer HE. Suppression of p53-mediated growth factor withdrawal-induced apoptosis in the myeloid compartment by hematopoietic cytokines: an overview of hematopoiesis and apoptosis with a presentation of thrombopoietin and the M07E cell line as a model system. *Crit Rev Oncol Hematol.* 31(3):169-191, 1999.

- 29) Nagata S.: Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365, 1997.
- 30) Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene*. 24;17(25):3261-3270, 1998.
- 31) Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci*. 23(2):74-79, 1998.
- 32) Inazawa J, Itoh N, Abe T, Nagata S. Assignment of the human Fas antigen gene (Fas) to 10q24.1. *Genomics*., 14(3):821-822, 1992.
- 33) M. Lenardo, F.K.-M. Chan, F. et al. Mature T lymphocyte apoptosis- Immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu. Rev. Immunol*. 17:221-253, 1999
- 34) D.H. Lynch, F. Ramsdell, M.R. Alderson Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunology Today* Vol.16 No.12, 1995.
- 35) Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 267:1449-1456, 1995.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) Pan G, Bauer J.H., Haridas V., et al. Identification and functional characterisation of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett*. 431:351, 1998.
- 39) D'Agnillo F, Alayash AI. Redox cycling of diaspirin cross-linked hemoglobin induces G2/M arrest and apoptosis in cultured endothelial cells. *Blood*. 1;98(12):3315-3323, 2001.
- 40) Siegel RM, Frederiksen JK, et al. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288(5475):2354-2357, 2000.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) J.P. Medema, C. Scaffidi, F.C. et al. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC), *The EMBO Journal* 16 n. 10: 2794-2804, 1997.

- 44) 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.
- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) S. Desagher, J.C. Martinou, Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trend in Cell Biology* (vol. 10), 2001.
- 49) De Maria R., Lenti L., Malisan F. et al.: Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 277, 1652-1655, 1997.
- 50) 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.
- 51) 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.
- 52) 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.
- 53) C. Scaffidi, S. Fulda, A. et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways, *The EMBO Journal* 17 n.6: 1675-1687, 1998.
- 54) Gross A. McDonnell JM. Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13(15): 1899-1911, 1999.
- 55) Rosse T. Olivier R. Monney L. et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391: 496-499, 1998.
- 56) Pan G. O'Rourke K. Dixit VM. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 273: 5841-5845, 1998.
- 57) Cheng EH. Kirsch DG. Clem RJ. et al. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278: 1966-1968, 1997.
- 58) Deveraux QL. Roy N. Stennicke HR. 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.

- 59) Seshagiri S. Miller LK. Baculovirus inhibitors of apoptosis (IAPs) block activation of Sf-caspase-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13606-13611, 1997.
- 60) Deveraux QL. Takahashi R. Salvesen GS. et al. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388: 300-304, 1997.
- 61) Ambrosini G. Adida C. Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3: 917-921, 1997.
- 62) Roy N. Deveraux QL. 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.
- 63) Dohi T, Okada K, Xia F, et al. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem.* 2004 Aug 13;279(33):34087-90. Epub 2004 Jun 24.
- 64) Lagace M. Xuan JY. Et al. Genomic organization of the X-linked inhibitors of apoptosis and identification of a novel testis-specific transcript. *Genomics* 77: 181-188, 2001.
- 65) Duckett CS. Nava VE. Gedrich RW. Et al. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 15: 2685-2694, 1996.
- 66) Farahani R, Fong WG, Korneluk RG, MacKenzie AE. Genomic organization and primary characterization of miap-3: the murine homologue of human X-linked IAP. *Genomics.* 1997 Jun 15;42(3):514-8.
- 67) Liston P, Roy N, Tamai K, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature.* 1996 Jan 25;379(6563):349-53.
- 68) Deveraux QL. Leo E. Stennicke HR. Welsh K. Salveen GS. and Reed JC. Cleavage of Human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 18: 5242-5251, 1999.
- 69) Takahashi R. Deveraux Q. Tamm I. Welsh K. Assa-Munt N. Salvesen GS. and Reed JC. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 273: 7787-7790, 1998.
- 70) Johnson DE, Gastman BR, et al. Inhibitor of apoptosis protein hILP undergoes caspase-mediated cleavage during T lymphocyte apoptosis. *Cancer Res.* 2000 Apr 1;60(7):1818-23.
- 71) Chai J. et al. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 104: 769-780, 2001.
- 72) Riedl SJ. et al. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 104: 791-800, 2001.
- 73) Huang Y. et al. Structural basis of caspase inhibition by XIAP. Differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104 : 781-790, 2001.

- 74) Sun C, Cai M, Gunasekera AH, et al. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature*. 1999 Oct 21;401(6755):818-22.
- 75) Sun C, Cai M, Meadows RP, et al. NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem*. 2000 Oct 27;275(43):33777-81.
- 76) PD Srinivasula SM, Hegde R, et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):112-6.
- 77) Bratton SB, Lewis J, Butterworth M, Duckett CS, Cohen GM. XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95- and Bax-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2002 Sep;9(9):881-92.
- 78) Datta R, Oki E, Endo K, Biedermann V, Ren J, and Kufe D. XIAP regulates DNA damage-induced apoptosis downstream of caspase-9 cleavage. *J Biol Chem* 275: 31733-31738, 2000.
- 79) Hinds MG, Norton RS, Vaux DL, Day CL. Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol*. 1999 Jul;6(7):648-51.
- 80) Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*. 2000 May 5;288(5467):874-7.
- 81) Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8662-7. Epub 2001 Jul 10.
- 82) Holcik M, Korneluk R. XIAP, the guardian angel. *Mol Cell Biol* 2: 550-556, 2001.
- 83) MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *J Biol Chem*. 2002 Sep 27;277(39):36611-6. Epub 2002 Jul 16.
- 84) 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*. 2000 Jul 7;102(1):33-42.
- 85) Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):43-53
- 86) Hegde R, Srinivasula SM, et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):432-8. Epub 2001 Oct 17.

- 87) Martins LM, Iaccarino I, et al. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem*. 2002 Jan 4;277(1):439-44. Epub 2001 Oct 15.
- 88) Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, et al. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*. 2001 Sep;8(3):613-21.
- 89) van Loo G, Saelens X, et al. Caspases are not localized in mitochondria during life or death. *Cell Death Differ*. 2002 Nov;9(11):1207-11.
- 90) Wu G, Chai J, Suber TL, Wu JW, Du C, Wang X, Shi Y. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* 2000 Dec 21-28;408(6815):1008-12.
- 91) Liu Z, Sun C, Olejniczak ET, Meadows RP, Betz SF, Oost T, Herrmann J, Wu JC, Fesik SW. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. *Nature*. 2000 Dec 21-28;408(6815):1004-8.
- 92) Sanna MG, Duckett CS, Richter BW, Thompson CB, Ulevitch RJ. Selective activation of JNK1 is necessary for the anti-apoptotic activity of hILP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 26;95(11):6015-20.
- 93) Sanna MG, da Silva Correia J, et al. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol Cell Biol*. 2002 Mar;22(6):1754-66.
- 94) Yamaguchi K, Nagai S, et al. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J*. 1999 Jan 4;18(1):179-87.
- 95) Sanna MG, da Silva Correia J, et al. ILPIP, a novel anti-apoptotic protein that enhances XIAP-mediated activation of JNK1 and protection against apoptosis. *J Biol Chem*. 2002 Aug 23;277(34):30454-62. Epub 2002 Jun 04
- 96) Birkey Reffey S, Wurthner JU, Parks WT, Roberts AB, Duckett CS. X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem*. 2001 Jul 13;276(28):26542-9. Epub 2001 May 16.
- 97) Levkau B, Garton KJ, Ferri N, Kloke K, Nofer JR, Baba HA, Raines EW, Breithardt G. XIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappaB : new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. *Circ Res*. 2001 Feb 16;88(3):282-90.
- 98) Hofer-Warbinek R, Schmid JA, Stehlik C, Binder BR, Lipp J, de Martin R. Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1. *J Biol Chem*. 2000 Jul 21;275(29):22064-8.
- 99) American Diabetes Association. Clinical practice recommendations. *Diabetes Care*. 28 (suppl 1):1-79. 2005.

- 100) Redondo MJ, Fain PR et al. Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res.* 56: 69-89. 2001.
- 101) Lambert AP, Gillespie KM et al. Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 4037-43. 2004.
- 102) Devendra D, Liu E et al. Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ.* 328: 750-54. 2004.
- 103) Abiru N, Kawasaky E et al. Current knowledge of Japanese type 1 diabetes syndrome. *Diabetes Metab Res Rev.* 18:357-66. 2002.
- 104) Bozzato GF et al. Clinical aspects of Immunology. *Scient Pub.* 1993.
- 105) Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev.* 15:516. 1994.
- 106) Bosi E, Todd I et al. Mechanism of autoimmunity: relevance to the pathogenesis of type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* 3:893. 1987.
- 107) Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet.* 367: 847-58. 2006.
- 108) Lammi N, Karvonen M et al. Do microbes have a casual role in type 1 diabetes? *Med Scin Monit.* 11: RA63-69. 2005.
- 109) Robles DT and Eisenbarth GS. Type 1A diabetes by infection and immunization. *J.Autoimmun.* 16:355-62. 2001.
- 110) Helgason T and Jonasson MR. Evidence for a food additive as a cause of ketosis-prone diabetes. *Lancet.* 318: 716-20. 1981.
- 111) Akerblom HK, Vaarala O et al. Environmental factors in the etiology of type I diabetes. *Am.J.Med.Genet.* 115:18-29. 2002.
- 112) Virtanen SM, Laara E et al. Cow's milk consumption, HLA-DQB1 genotype, and type I diabetes: a nested case-control study of siblings of children with diabetes. Childhood diabetes in Finland study group. *Diabetes.* 49:912-17. 2000.
- 113) Vaarala O, Knip M et al. Cow's milk formula feeding induces primary immunization to insulin in infantsnat genetic risk for type I diabetes. *Diabete.* 48:1389-94. 1999.
- 114) Thorsdottir I and Ramel A. Dietary intake of 10-to16-years-old children and adolescents in central and northern Europe and association with the incidence of type I diabetes. *Ann.Nutr.Metab.* 47: 267-75. 2003.
- 115) Norris JM, Barriga K et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. *JAMA.* 290:1713-20. 2003.



- 116) Bottazzo GF, Florin-Christensen A et al. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*. 2(7892):1279-83. 1974.
- 117) Baekkeskov S, Nielsen JH et al. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. *Nature*. 298(5870):167-9. 1982
- 118) Palmer JP, Asplin CM et al. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. *Science*. 222(4630):1337-9. 1983.
- 119) Barker JM, Yu J et al. Autoantibody “subspecificity” in type 1 diabetes: risk for organ-specific autoimmunity clusters in distinct groups. *Diabetes Care*. 28: 850-55. 2005.
- 120) Kordonouri O, Hartmann R et al. Natural course of autoimmune thyroiditis in type 1 diabetes: association with gender, age, diabetes duration, and puberty. *Arch Dis Child*. 90(4):411-4. 2005.
- 121) Kovbjerg H, Tarnow L et al. The prevalence of coeliac disease in adult Danish patients with type 1 diabetes with and without nephropathy. *Diabetologia*. 48(7):1416-7. 2005.
- 122) Norris JM, Barriga K et al. Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA*. 293(19):2343-51. 2005.
- 123) Lee SC and Pervaiz S. Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(3): 497-504. 2007.
- 124) Trudeau JD, Dutz JP et al. Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes*. 49(1):1-7. Review. 2000.
- 125) Wang Y, Pontesilli O et al. The role of CD4+ and CD8+ T cells in the destruction of islet grafts by spontaneously diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88(2): 527-31. 1991.
- 126) Katz JD, Benoist C et. T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. *Science*. 268(5214):1185-8. 1995.
- 127) Christianson SW, Shultz LD et al. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes*. 42(1):44-55. 1993.
- 128) Appels B, Burkart V et al. Spontaneous cytotoxicity of macrophages against pancreatic islet cells. *J Immunol*. 142(11):3803-8. 1989.
- 129) Lee MS, Chang I et al. Death effectors of  $\beta$ -cell apoptosis in type 1 diabetes. *Mol Gen and Metab*. 83: 82-92. 2004.

- 130) Chervonsky AV, Wang Y et al. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell*. 89(1):17-24. 1997.
- 131) Dianzini U, Bragardo M et al. Deficiency of Fas apoptosis pathway without Fas gene mutation in pediatric patients autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood*. 89 :2871. 1997.
- 132) Ramenghi U, Bonisconi S et al. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutation is a familiar trait predisposing to development of autoimmune disease and cancer. *Blood*. 95 :3176. 2000.
- 133) Comi C, Leone M et al. Defective T cell Fas function in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 55: 921. 2000.
- 134) De Franco S, Bonisconi S et al. Defective Fas function of Fas in patients with tipe 1 diabetes associated with other autoimmune diseases. *Diabetes*. 50: 483. 2001.
- 135) Bona G, De Franco S et al. Defective function of Fas in T cells from paediatric patients with autoimmune thyroid diseases. *Clin. Exp. Immunol*. 133: 430. 2003.
- 136) Comi C, Gaviani P et al. Fas-mediated T cell apoptosis is impaired in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Peripher. Nerv. Syst*. 11: 53. 2006.
- 137) Vendrame F, Santangelo C et al. Defective lymphocyte caspase-3 expression in type 1 diabetes mellitus. *Eur. J. Endocrinol*. 152: 119. 2005
- 138) Richiusa P, Pizzolanti G et al. Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes Nutr. Metab*. 17: 6. 2004
- 139) Straus SE, Sneller M et al. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis .... *Ann. Intern. Med*. 6. 1999
- 140) Galeazzi M, Gasbarrini G et al. Autoinflammatory syndromes. *Clin. Exp. Rheumatol*. 24: 579. 2006
- 141) Fietta P. Autoinflammatory diseases: the hereditary periodic fever syndromes *Acta Biomed* 75: 579. 2004
- 142) Bhat A, Naquwa SM et al. Genetics and new treatment modalities for familial Mediterranean fever. *Ann. NY Acad*. 1110: 201. 2007
- 143) Haas D, Hoffmann GF. Mevalonate kinase deficiencies: from mevalonic aciduria to HIDS. *Orphanet J Rare Dis*. 26: 1. 2006
- 144) Stojanov S, McDermmott MF. The tumor necrosis factor receptor associated periodic syndromes: current concept. *Expert. Rev. Mol. Med*. 10: 1. 2005
- 145) Kanazawa N, Furukawa F. Autoinflammatory syndromes with a dermatological perspective. *J.Dermatol* 34: 601. 2007

- 146) Shinkai K, McCalmont TH et al. Cryopyrin-associated periodic syndrome and autoinflammation. *Clin. Exp. Dermatol.* 33: 1. 2008
- 147) Feder HM. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, adenitis: a clinical review of a new syndrome. *Curr. Opin. Pediatr.* 12: 253. 2000
- 148) Lee WI, Yang MH et al. PFAPA syndrome (Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, adenitis). *Clin. Rheumatol.* 18: 207. 1999
- 149) Dinarello CA. Mutation in Cryopyrin: bypassing roadblocks in the caspase-1 inflammasome for interleukin-1 $\beta$  secretion and disease activity. *Arthritis Rheum.* 56: 2817. 2004
- 150) Houten SM, Frenkel J et al. Temperature dependence of mutant mevalonate kinase activity as a pathogenic factor in HIDS and periodic fever syndromes. *Hum. Mol. Genet.* 11: 3115. 2002
- 151) Frenkel J, Rijkers GT et al. Lack of isoprenoids products raises ex vivo IL-1 $\beta$  secretion in HIDS and periodic fever syndromes. *Arthritis Rheum.* 46: 2794. 2002
- 152) Baker SJ, Reddy EP et al. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene.* 24: 3261. 1998
- 153) Zheng L, Bidere N et al. Competitive control of independent programs of TNFR-induced cell death by TRADD and RIP1. *Mol. Cell Biol.* 26: 3505. 2006
- 154) Wajant H, Pfizenmaier K et al. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10: 45. 2003
- 155) Micheau O, Tschopp J. Induction of TNFR1-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 114: 148. 2003
- 156) McDermott MF et al. Germline mutation in the extracellular domain of TNFR1. *Cell* 97: 133. 1999
- 157) D'Ossualdo et al. Neutrophils from patients with TNFRSF1A mutation display resistance to TNF-induced apoptosis. *Arthritis Rheum.* 54: 998. 2006
- 158) Siebert S, Fielding CA et al. Mutation of the extracellular domain of TNFR causes reduced NF- $\kappa$ B activation due to decreased surface expression. *FEBS Lett.* 26: 5193. 2005
- 159) Papa S, Zazzeroni F. et al. Linking JNK signaling to NF- $\kappa$ B: a key to survival. *J. Cell. Sci.* 117: 5197. 2004
- 160) Bubici C, Papa S et al. NF- $\kappa$ B and JNK. *Cell Cycle.* 3: 1524. 2004
- 161) Kaur S, Wang F et al. XIAP inhibits JNK1 activation by TGF- $\beta$ 1 through ubiquitin mediated proteasomal degradation of TAK1. *J. Biol. Chem.* 280: 38599. 2005

- 162) Lu M, Lin SC et al. XIAP induces NF- $\kappa$ B activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol. Cell.* 26: 689. 2007.
- 163) Thomas KT, Feder HM et al. Periodic fever syndrome in children. *J. Pediatr.* 135: 15. 1999
- 164) DeSaint Basile G, Fisher A. Defective cytotoxic granule-mediated cell death pathway impairs T lymphocytes homeostasis. *Curr.Opin. Rheumatol.* 15: 436. 2003
- 165) Rathmell JC, Thompson CB. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis and disease. *Cell* 109: S97. 2002
- 166) Purtilo DT, Cassel CK et al. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency. *Lancet* 1: 935. 1975.
- 167) Nichols KE, Ma CS et al. Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol. Rev.* 203: 180. 2005.
- 168) Gaspar H, Sharifi R et al. X-linked lymphoproliferative disease: clinical, diagnostic and molecular perspective. *Br.J.Haematol.* 119: 585. 2002.
- 169) Nichols K et al. Inactivating mutation in an SH2 domain-encoding gene in XLP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13765. 1998.
- 170) Sayos J et al. The XLP gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature.* 395: 462. 1998.
- 171) Coffey et al. Host response to EBV infection in XLP results from mutation in an SH2-domain encoding gene. *Nature Genet.* 20: 129. 1998.
- 172) Nichols K et al. Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nature Med.* 11: 340. 2005.
- 173) Pasquier B et al. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the XLP gene product. *J.Exp. Med.* 201: 695. 2005.
- 174) Rigaud S, Fondanèche MC et al. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature.* 444: 110. 2006.

## PUBBLICAZIONI

1. Comi C, Gaviani P, Leone M, Ferretti M, Castelli L, Mesturini R, Ubezio G, Chiocchetti A, Osio M, Muscia F, Bogliun G, Corso G, Gavazzi A, Mariani C, Monaco F, Dianzani U. *Fas-mediated T-cell apoptosis is impaired in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*. J Peripher Nerv Syst. 2006 Mar;11(1):53-60
2. 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, Locatelli F, Maccario R, Ramenghi U, Dianzani U. *Variation of the perforin gene in patients with autoimmune/lymphoproliferation and defective fas function*. Blood. 2006 Nov 1;108(9):3079-84
3. Mesturini R, Nicola S, Chiocchetti A, Bernardone IS, Castelli L, Bensi T, Ferretti M, Comi C, Dong C, Rojo JM, Yagi J, Dianzani U. *ICOS cooperates with CD28, IL2 and INF-gamma and modulates activation of human naive CD4+ T cells*. Eur J immunol. 2006 Oct.;36(10):2601-12.
4. DeFranco S, Chiocchetti A, Ferretti M, Castelli L, Cadario F, Cerutti F, Rabboni I, Indelicato M, Mazzarino C, Chessa M, Bona G, Dianzani U. *Detective function of the Fas apoptotic pathway in Type I diabetes mellitus correlates with age at onset*. Int J Immunopathol Pharmacol. 2007; 20 (3), 567-576.
5. Zavattaro E, Azzimonti B, Mondini M, DeAndrea M, Borgogna C, Dell'Oste V, Ferretti M, Nicola S, Cappellano G, Carando A, Leigh G, Landolfo S, Dianzani U, Gariglio M. *Identification of defective Fas function and variation of Perforin gene in an Epidermodysplasia Verruciformis patient lacking EVER1 and EVER2 mutations*. Journal of Investigative Dermatology. 25 Ottobre 2007
6. Cerutti E, Campagnoli MF, Ferretti M, Garelli E, Crescenzino N, Rosolen A, Chiocchetti A, Lenardo M, Ramenghi U, Dianzani U. *Co-inherited mutations of Fas and caspase-10 in development of the autoimmune lymphoproliferative syndrome*. BMC Immunology. 2007 Nov. 13; 8(1):28
7. Orilieri E, Cappellano G, Clementi R, Cometa A, Ferretti M, Cerutti E, Cadario F, Martinetti M, Larizza D, Calcaterra V, D'Annunzio G, Lorini R, Cerutti F, Bruno G, Chiocchetti A, Dianzani U. *Variation of the perforin gene in patients with Type I Diabetes*. Diabetes 2008, Jan 15; [Epub ahead of print]