



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo

Ciclo XXIII

TITOLO TESI

**Definizione del ruolo della proteina AIRE
attraverso la ricerca di proteine interagenti**

Settore scientifico disciplinari di afferenza

BIO/11 BIOLOGIA MOLECOLARE

Presentata da:	Dott.ssa Federica Incani
Coordinatore Dottorato	Prof. R. Galanello
Relatore	Prof.ssa M.C. Rosatelli

Esame finale anno accademico 2009 - 2010

*“...Non vogliate negar l'esperienza
di retro al sol, del mondo senza gente.
Considerate la vostra semenza
fatti non foste a viver come bruti
ma per seguir virtute e canoscenza”*

Dante Inferno canto XXVI, 116-120

INDICE

<i>Sommario</i>	<i>Pag. 4</i>
<i>Introduzione</i>	<i>Pag. 6</i>
<i>Obiettivi dello studio</i>	<i>Pag. 71</i>
<i>Materiale e Metodi</i>	<i>Pag. 73</i>
<i>Risultati</i>	<i>Pag. 108</i>
<i>Discussione</i>	<i>Pag. 127</i>
<i>Conclusioni</i>	<i>Pag. 133</i>
<i>Bibliografia</i>	<i>Pag. 135</i>

SOMMARIO

Il sistema immunitario protegge l'organismo da agenti patogeni. infettanti. Per il buon funzionamento del sistema immunitario è necessario che le cellule immunitarie siano in grado di discriminare gli antigeni tissutali propri ("self") da quelli estranei il ("non self"). Il sistema immunitario ha perfezionato diversi meccanismi per prevenire il danno ai tessuti "self", anche se spesso le differenze tra self e non self sono molto sottili, infatti i patogeni stessi sono costituiti da proteine e biomolecole spesso in comune con l'uomo. Quando il sistema immunitario perde la capacità di distinguere il self dal non self causa la comparsa di una reazione immune contro le proprie cellule e tessuti.

L'autoimmunità ha origine, dunque, dall'incapacità o dalla rottura dei meccanismi responsabili del mantenimento della tolleranza al self da parte dei linfociti. I fattori più importanti che contribuiscono allo sviluppo delle malattie autoimmuni sono fattori genetici e fattori ambientali scatenanti, come gli episodi infettivi.

La predisposizione genetica alla maggior parte delle malattie autoimmunitarie è dovuta ad effetti combinatori di più geni. Sono molto pochi, invece i disordini autoimmuni ad eziologia monogenica. Nonostante queste forme autoimmuni siano così rare, esse possono contribuire a chiarire meglio le basi molecolari dei processi

della normale tolleranza immunologica e di conseguenza aiutare a capire lo sviluppo delle più comuni malattie autoimmuni.

L'APECED (**A**utoimmune **P**oly**E**ndocrinopathy **C**andidiasis **E**ctodermal **D**ystrophy) o **APS1** è una di queste rare patologie ad ereditarietà monogenica. I pazienti affetti da questa sindrome soffrono di diverse manifestazioni autoimmuni organo-specifiche che colpiscono in genere gli organi endocrini. La diagnosi è basata sulla presenza di almeno due dei tre sintomi principali che sono: candidiasi cronica mucocutanea, ipoparatiroidismo e insufficienza adrenocorticale (morbo di Addison).

Il gene difettivo (**AIRE**) è stato identificato nel 1997. Il nome, "**Autoimmune Regulator**", indica la sua funzione nello sviluppo e nel mantenimento della tolleranza immunologica verso il self.

Studi condotti sia *in vivo* che *in vitro* indicano una funzione di AIRE come regolatore trascrizionale che controlla l'espressione ectopica di antigeni self nel timo. Tuttavia il meccanismo di questa regolazione rimane ancora largamente sconosciuto.

L'obiettivo del nostro studio è quello di identificare le proteine che interagiscono con AIRE e che regolano la sua attività. La scoperta di nuovi "partner" di AIRE potrebbe fornire un quadro più chiaro riguardo il meccanismo d'azione di AIRE e sulla sua attività regolatoria.

INTRODUZIONE

SISTEMA IMMUNITARIO

Il sistema immunitario rappresenta il principale meccanismo di difesa dell'organismo contro i patogeni, accanto alle barriere chimiche e fisiche rappresentate dalla pelle e dalle mucose. Gli organi e le cellule che lo compongono garantiscono una risposta rapida, efficace e in molti casi completamente protettiva verso numerosi microorganismi quali batteri, virus, funghi e parassiti eucarioti, potenzialmente patogeni, con cui siamo costantemente a contatto. Classicamente, si parla di due tipi di immunità, innata e adattativa (Ochsenbein, AF. and Zinkernagel RM. 2000). La risposta innata costituisce una prima linea difensiva contro molti dei comuni patogeni ed è quindi essenziale per il controllo delle comuni infezioni. Ma i componenti del sistema immunitario innato non sono sempre in grado di eliminare i microorganismi infettivi. Le cellule del sistema immunitario acquisito si sono evolute per una difesa più versatile e capace di

aumentare anche la protezione contro una seconda infezione causata dallo stesso patogeno; inducendo e mantenendo la memoria immunitaria adattativa. Questi due tipi di immunità non sono sistemi isolati ma fanno parte di un più grande complesso. Le cellule del sistema immunitario innato innescano la risposta contro l'infezione e indirizzano l'infezione verso la risposta immunitaria acquisita (Janeway CA. et al.,2008).

Componenti principali del sistema immunitario

Il sistema immunitario contiene una moltitudine di differenti cellule e molecole con specifiche funzioni e caratteristiche. I principali tipi di cellule del sistema immunitario sono mostrati in figura 1.

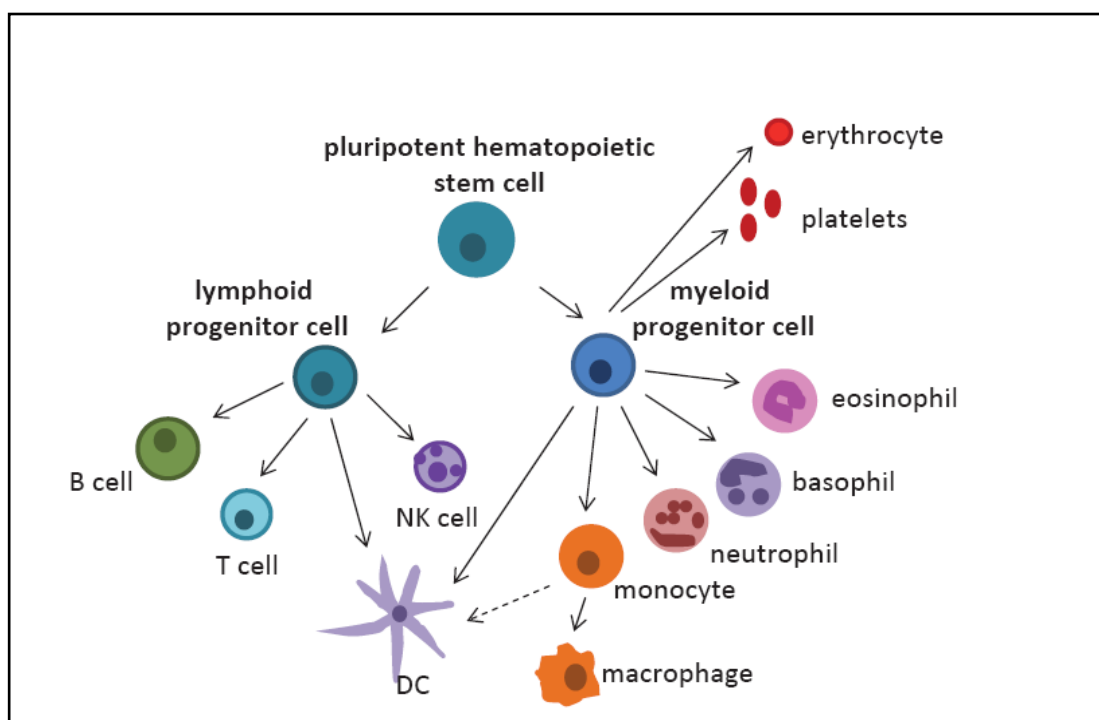


Fig 1: Cellule del sistema immunitario umano I Leucociti si differenziano da cellule staminali pluripotenti ematopoietiche e si differenziano nella linea linfoidale e mieloide. Le cellule T e B le cellule Natural Killer (NK) e le cellule dendritiche (DC) si differenziano dai progenitori linfoidi. Monociti Macrofagi Granulociti da progenitori mieloidi (Da Pontynen N "Of Tolerance in mice and men –studies in APECED and AIRE" 2008).

Il sistema immunitario innato è costituito da neutrofili, basofili, eosinofili, monociti macrofagi e Natural Killer (NK). Anche il sistema del complemento è un componente fondamentale dell'immunità innata.

La risposta immunitaria adattativa coinvolge i linfociti T e B, che attraverso i loro recettori (TCR e BCR) riconoscono i peptidi antigenici. Questi recettori sono generati attraverso riarrangiamenti somatici del DNA che garantiscono la formazione di una molecola unica per ogni singolo clone linfocitario. L'espansione di un clone linfocitario in seguito all'incontro con l'antigene garantisce il mantenimento della memoria immunitaria e la maggiore rapidità delle successive risposte ad un determinato patogeno.

Le altre cellule coinvolte nel sistema immunitario adattativo sono le cellule specializzate a presentare l'antigene (Antigen-Presenting Cells [APC] o cellule accessorie), che hanno la funzione di presentare gli antigeni e attivare i linfociti e le cellule effettrici che hanno il compito di eliminare gli antigeni.

I linfociti si compongono di sottopopolazioni distinte dotate di molecole e funzioni diverse, pur essendo molto simili dal punto di vista morfologico.

I linfociti B sono le cellule che producono gli anticorpi e la loro maturazione avviene nel midollo osseo le sottopopolazioni principali dei linfociti B sono le cellule B naïve, cellule B della memoria e plasmacellule che vengono attivate in B cellule che producono anticorpi.

Vi sono poi i linfociti T che sono i mediatori dell'immunità cellulare e maturano nel Timo. I linfociti T si dividono in due sottopopolazioni principali: i T helper e i linfociti T citotossici (Cytotoxic T Lymphocytes, CTL), che esprimono un recettore per l'antigene chiamato α/β . Le cellule T CD4⁺ con funzione regolatoria (Tregs) sono ormai riconosciute come una terza sottopopolazione di linfociti T che esprime il recettore α/β .

Un'altra sottopopolazione di cellule T, chiamate T $\gamma\delta$, esprime un tipo di recettore simile a α/β , ma strutturalmente diverso.

Oltre alle cellule, il sistema immunitario contiene inoltre composti che vengono secreti come il complemento, chemochine e citochine. Le citochine sono piccole proteine di circa 25 kDa, che vengono prodotte in vari tipi di cellule, di solito indotte da varie risposte cellulari (Abbas AK. et al., 2010).

Le chemochine vengono prodotte da vari tipi di cellule, sono comunemente coinvolte nell'infiammazione, ma anche nello sviluppo e nella migrazione dei linfociti (Moser B. et al., 2004) (Janeway CA et al., 2008).

TIMO

Il sistema immunitario è costituito da diverse cellule ma anche da tessuti o organi composti da cellule di origine linfoide, anatomicamente definiti, in cui vengono trasportati e concentrati gli antigeni. I tessuti linfoidi vengono classificati in organi linfoidi primari, dove i linfociti acquisiscono la capacità di esprimere i

recettori per l'antigene e raggiungono la maturità fenotipica e funzionale, e in organi linfoidi secondari, o periferici, in cui hanno inizio e si sviluppano le risposte linfocitarie agli antigeni. Gli organi linfoidi primari sono il midollo osseo, da cui hanno origine tutti i linfociti, e il timo dove i linfociti maturano e raggiungono lo stadio di competenza funzionale. I tessuti linfoidi funzionali comprendono i linfonodi, la milza, il sistema immunitario cutaneo e il sistema immunitario associato alle mucose (Janeway CA. et al.,2008).

Il timo è quindi il primo organo linfoide deputato allo sviluppo e il differenziamento delle cellule T che avviene grazie al contatto fisico diretto tra queste e il tessuto stromale in cui sono immerse.

La struttura e la composizione del timo sono conservati durante l'evoluzione (Anderson G. et al.,2001).

Il timo deriva da invaginazioni dell'ectoderma che avvengono a livello embrionale con la formazione delle cosiddette tasche branchiali. Durante lo sviluppo embrionale il timo aumenta di dimensioni e si compartimentalizza. Vari fattori sono stati identificati essere fondamentali per lo sviluppo del timo tra cui FOXN1 (fork-head boxN1), T-box (TBX1), e pre B cell Leukemia Transcription Factor (PBX1). Normalmente la sua funzionalità e le sue dimensioni diminuiscono nell'adulto (involuzione timica) (Janeway CA. et al.,2008), (Rodewald HR. 2008), (Boyed RL. et al.,1993).

Il timo, situato nel mediastino anteriore, è un organo bilobato ed ogni lobo è suddiviso in molteplici lobuli da setti fibrosi e ogni lobulo è formato da aree anatomicamente separate che includono l'area sub capsulare la corteccia, la giunzione cortico-medullare e la medulla.

Le cellule epiteliali timiche (TECs) sono la componente maggiore del tessuto stromale timico e possono essere suddivise a seconda della loro funzione, morfologia, e specifico profilo antigenico in differenti sottopopolazioni: corticali (c) e medullari (m) TECs. I vari tipi di TECs insieme alle altre cellule stromali, sia di origine ematopoietica (cellule dendritiche DC, macrofagi) e di origine non ematopoietica (fibroblasti e cellule endoteliali) determinano una struttura tridimensionale "three-dimensional-meshwork" (a differenza degli altri organi in cui l'organizzazione spaziale si presenta come un foglio di cellule più o meno stratificato) e lo spazio tra le diverse cellule stromali è occupato dai timociti in differenti stadi di sviluppo (Boyd RL. et al., 1993), (van Ewijk W. et al., 1994), (Pearse G. 2006), (Takahama Y. 2006) (Fig.2-3).

Il tessuto stromale timico assicura il giusto sviluppo delle cellule T. Inizialmente fa in modo che i precursori linfoidi appena giunti, attraverso i vasi sanguigni della regione corticale, maturino lungo la linea differenziativa dei linfociti T. In seguito assicura il riconoscimento del self (selezione positiva) e l'eliminazione dei cloni T autoreattivi (selezione negativa) (Petrie HT., 2003) (Starr TK. et al., 2003).

Le cellule T immature si trovano nella regione corticale, insieme alle cellule epiteliali e macrofagi con cui interagiscono fisicamente. La selezione positiva avviene proprio in questa regione.

I timociti maturi si trovano invece, nella regione medullare insieme a numerose cellule epiteliali, alcuni macrofagi e DC. La selezione negativa avviene interamente nella zona medullare. In questa regione vi sono delle specifiche strutture chiamate corpuscoli di Hassal, formati da spirali di cellule epiteliali strettamente impacchettate che recentemente è stato dimostrato essere importanti per la tolleranza centrale. Sembra che questi corpuscoli siano coinvolti nella maturazione dei timociti e nell'eliminazione dei timociti apoptotici. E' noto ormai da tempo che un particolare tipo di chemochine, chiamate "thymic stromal lymphopoietin" (TSLP) sono altamente espresse nei corpuscoli di Hassal. Le TSLP attivano le DC, le quali a loro volta attivano la produzione di cellule T regolatorie (Tregs). Sia le DCs che le Tregs hanno un ruolo importante nella genesi della tolleranza centrale (Watanabe et al., 2004).

Esiste dunque un coordinamento tra sviluppo delle cellule T e la corretta architettura timica. Da una parte è necessario per la maturazione dei timociti, che essi intraprendano le giuste interazioni cellulari, attraverso una migrazione con un ben preciso ordinamento anatomico, dall'altra parte le cellule stromali timiche hanno bisogno di interagire con i timociti in via di sviluppo per mantenere la

corretta organizzazione cellulare nei vari compartimenti stromali (van Ewijk W. et al., 1994), (van Ewijk W. et al., 2000).

In questo processo le chemochine hanno un ruolo importante. Esse vengono secrete dalle cellule stromali e riconosciute dai recettori dei linfociti. Nei topi knock-out per CCR7 e CCR9 si osservano alterazioni nello sviluppo del timo e nel reclutamento dei pre-timociti suggerendo che, questi recettori per le chemochine guidano il movimento dei progenitori delle cellule T verso il timo dalla corticale fino alla midollare. La mancanza delle chemochine può causare l'arresto dello sviluppo delle cellule T (Ueno T. et al., 2004), (Shores EW. et al., 1991).

La proliferazione delle mTEC è guidata anche dal fattore di crescita dei fibroblasti FGF-7, noto anche come fattore di crescita dei cheratinociti, e dal recettore per la linfofossina β (LT β R).

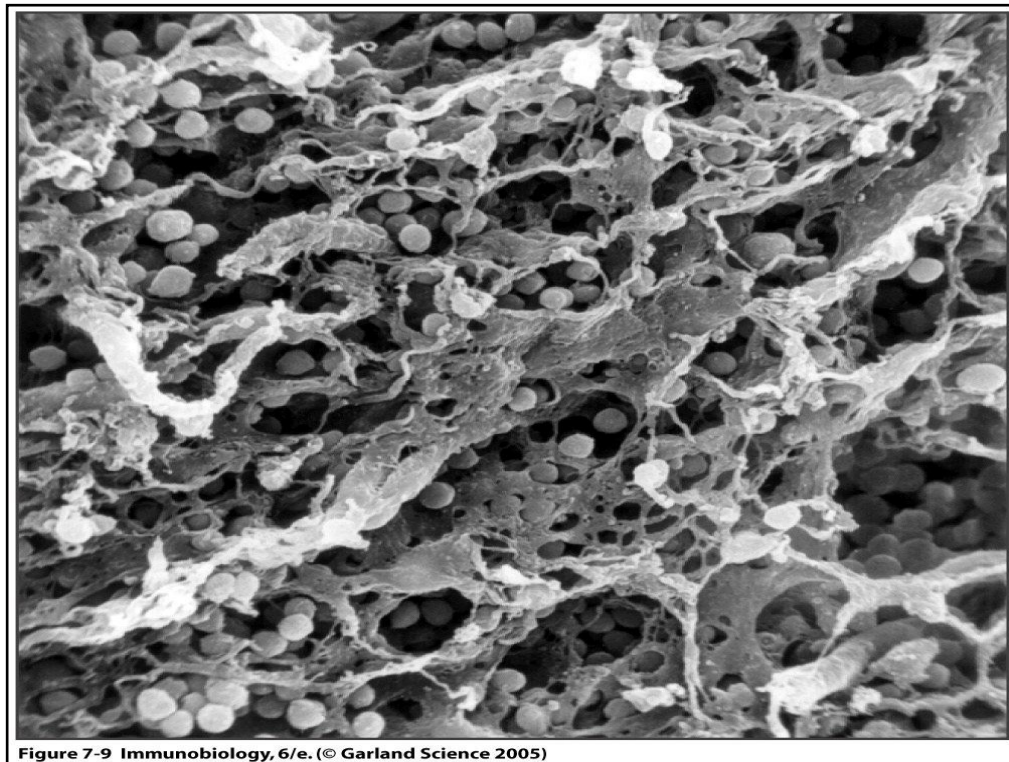


Fig.2: Struttura del Timo: La figura mostra la struttura tridimensionale “three dimensional meshwork”.

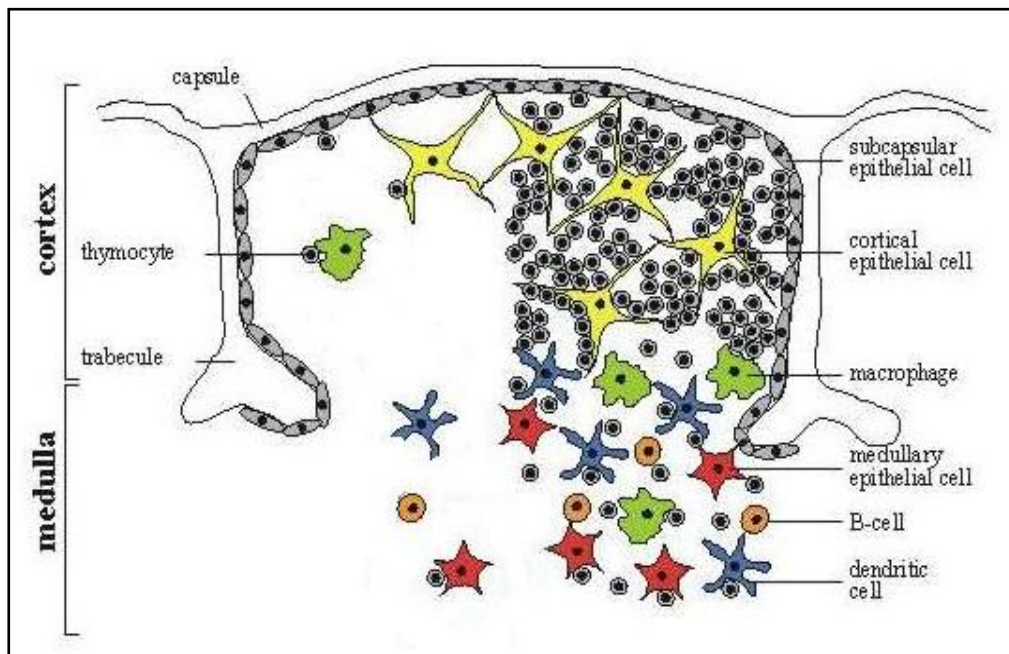


Fig.3: Composizione cellulare del Timo (Adattata da Petrie HT. Cell Nat Rev Immunol.2003).

Cellule T

La principale funzione dei linfociti T è la difesa contro i microrganismi intracellulari e l'attivazione di altre cellule, come i macrofagi e i linfociti B. Queste funzioni richiedono che i linfociti T interagiscano con altre cellule (APC cell) che possono essere cellule dell'ospite infettate, cellule dendritiche, macrofagi e linfociti B. I linfociti T sono capaci di interagire con queste cellule poiché i loro recettori per l'antigene sono in grado di riconoscere solamente antigeni esposti sulla superficie di altre cellule.

Il buon funzionamento delle cellule T presuppone il buon riconoscimento di strutture peptidiche autologhe (self) da quelle estranee (non self).

L'esposizione degli antigeni sulla membrana cellulare affinché possano essere riconosciuti dai linfociti T, avviene per mezzo di speciali proteine che sono codificate da geni in un locus: il complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Vi sono due principali prodotti dei geni MHC. MHC di classe I e MHC di classe II, che discriminano fra i diversi tipi di proteine antigeniche.

Le MHC di classe I sono espresse su tutte le cellule nucleate, mentre le MHC di classe II sono espresse soprattutto sulle cellule specializzate nella presentazione dell'antigene, come i macrofagi, i linfociti B e pochi altri tipi di cellule come dendritiche ed epiteliali timiche.

Entrambe le classi delle molecole MHC sono strutturalmente simili e consistono in una tasca extracellulare capace di legare i peptidi. All'interno della tasca vi sono dei residui aminoacidici altamente polimorfici (variabili). Questa parte della molecola lega i peptidi per presentarli ai linfociti T. A causa della variabilità degli aminoacidi in questa regione, molecole MHC differenti legano ed espongono peptidi differenti.

Le molecole MHC non discriminano però tra peptidi estranei e peptidi tissutali propri. Così le molecole MHC espongono sia peptidi self sia peptidi estranei e i linfociti sono deputati al riconoscimento degli antigeni estranei (Abbas AK. et al.,2010).

I T linfociti riconoscono l'antigene attraverso l'uso di un specifico TCR (T cell antigen receptor).

Sulla maggior parte delle cellule T, i TCR sono costituiti da due catene α e due catene β transmembranarie, legate covalentemente attraverso ponti disolfuro. I loci genetici che codificano le catene α e β sono localizzati su cromosomi diversi. Come il locus di una catena anticorpale, i loci del TCR contengono segmenti genici V, D, J separati, che sono uniti tramite ricombinazione sito-specifica durante lo sviluppo delle cellule T nel timo. Le regioni V delle catene α e β del TCR contengono nella loro sequenza brevi tratti in cui si concentra la variabilità tra i diversi TCR; queste regioni ipervariabili costituiscono le "Complementary Determining Regions," CDR. Queste regioni contengono anche sequenze che non sono presenti nella linea germinativa ma che si generano attraverso l'aggiunta casuale di nucleotidi da parte

dell'enzima deossiribonucleotiltransferasi (TdT). La gran parte della variabilità di sequenza del TCR è quindi concentrata nel CDR (Carding and SR. and Egan PJ., 2002), (Janeway CA. et al.,2008).

Un meccanismo che non è presente nella maturazione dei T linfociti è invece l'ipermutazione somatica stimolata dagli antigeni. L'affinità dei recettori tende ad essere perciò bassa. Le cellule T, d'altro canto, compensano questa scarsa affinità aumentando l'avidità, che si verifica quando i TCR multipli si legano simultaneamente a ligandi multipli legati alla membrana.

Inoltre, vari corecettori e proteine di adesione cellula-cellula rafforzano notevolmente il legame di una cellula T ad una cellula che presenta l'antigene o ad una cellula bersaglio.

Una minoranza di cellule T invece di produrre catene α e β produce un tipo diverso ma correlato di recettore eterodimero, composto da catene γ e δ . Sebbene queste cellule costituiscano il 5-10% delle cellule T rappresentano la popolazione dominante negli epiteli. Le funzioni di queste cellule non sono ancora ben conosciute (Reiner SL., 2007).

I segnali biochimici che sono innescati dal riconoscimento dell'antigene non sono trasdotti dal TCR ma da proteine non polimorfe chiamate CD3 e ζ , che sono legate in maniera non covalente al TCR e formano il complesso del TCR.

Le proteine CD3 e ζ , sono identiche in tutti i linfociti T indipendentemente dalla loro specificità e questo riflette il loro ruolo di proteine coinvolte nella trasduzione del segnale e non nel riconoscimento dell'antigene.

I linfociti T esprimono inoltre altri recettori, molecole accessorie, di membrana che non riconoscono l'antigene ma aiutano a stabilizzare l'interazione aumentando la forza totale dell'adesione cellula-cellula. Vi sono alcuni recettori detti corecettori, che hanno un ruolo diretto nell'attivazione delle cellule T generando dei segnali intracellulari. I corecettori meglio conosciuti sono le proteine CD4 e CD8. Esse legano regioni non polimorfe delle molecole MHC e facilitano la trasduzione del segnale, che insieme a quelli inviati dal complesso TCR avviano l'attivazione dei linfociti T. Il CD4 è espresso sia sulle cellule T helper che sulle cellule T regolatrici e si lega alle proteine MHC di classe II, mentre CD8 è espresso sulle cellule T citotossiche e si lega alle proteine di MHC di classe I. Perciò CD4 e CD8 contribuiscono al riconoscimento della cellula T aiutandola a concentrarsi su particolari proteine MHC e quindi su particolari tipi di cellule bersaglio; il riconoscimento delle proteine MHC di classe I permette alle cellule T citotossiche di concentrarsi su qualsiasi cellula ospite, mentre il riconoscimento delle proteine MHC di classe II permette alle cellule T helper di concentrarsi su una piccola sottopopolazione di cellule, le più importanti delle quali sono le cellule dendritiche, i macrofagi e le cellule B (Abbas AK. et al., 2010).

L'affinità di queste interazioni è aumentata da molecole accessorie quali CD54 e CD58 sulle APC che interagiscono con CD18 e CD2 sulle cellule T (Tseng SY. and Dustin ML. 2002), (Reiner SL. 2007), (Appay V. et al.,2008).

MATURAZIONE DEI T LINFOCITI E MECCANISMO DELLA TOLLERANZA CENTRALE

I linfociti sono le uniche cellule dell'organismo in grado di discriminare e riconoscere in modo specifico determinanti antigenici antigeni specifici e sono pertanto responsabili delle due caratteristiche che definiscono le risposte immunitarie adattative, la specificità e la memoria.

In particolare i linfociti T hanno un ruolo fondamentale nello sviluppo e nel mantenimento della tolleranza verso il self. Il controllo della tolleranza immunologica da parte dei T linfociti avviene a due livelli. Primo, durante la maturazione nel timo, le cellule T vengono selezionate in base alla loro reattività verso il self, in un processo che prende il nome di tolleranza centrale. Tuttavia alcune cellule T potenzialmente autoreattive sfuggono alla selezione timica ma sono

mantenute sotto controllo da meccanismi della tolleranza periferica (Janeway CA. 2008).

La maturazione dei linfociti a partire dai progenitori specifici segue diverse fasi consecutive che consistono nel riarrangiamento e nell'espressione dei geni del TCR, nella proliferazione cellulare, nella selezione indotta dall'antigene e nell'acquisizione di capacità funzionali (Abbas AK. et al., 2010).

I linfociti T originano da precursori che nascono nel fegato fetale e nel midollo osseo adulto e poi migrano nel timo (Fig.4). I timociti nel timo ricevono gli stimoli necessari per la proliferazione e la maturazione. Infatti per la maturazione dei linfociti T sono necessari due tipi di molecole prodotte dalle cellule timiche non linfoidi. Le prime sono le molecole MHC di classe I e II espresse dalle cellule epiteliali e dendritiche nel timo. Le seconde sono le cellule stromali timiche comprese le epiteliali che liberano citochine e chemochine (CCL21 e CCL19) che rispettivamente stimolano la proliferazione dei linfociti T immaturi e controllano il passaggio della corticale alla midollare dei timociti in via di sviluppo.

I timociti immaturi appena giunti nel timo (Fig. 3) non esprimono il complesso del TCR e sono detti doppio negativi (DN).

I timociti (DN) in questo stadio subiscono il riarrangiamento dei segmenti D-J-V al locus della catena β . Il meccanismo che porta al riarrangiamento di ricombinazione è simile a quello dei geni per le Ig, infatti nel locus TCR si ritrovano le stesse

sequenze conservate di sette e nove nucleotidi adiacenti alle catene V-D-J e gli spaziatori di dodici e ventitrè nucleotidi, descritti inizialmente per le immunoglobuline. Questo processo casuale crea un TCR con un repertorio di 1×10^{15} possibilità. L'alta variabilità degli eterodimeri viene assicurata anche dall'attività della deossiribonucleotidil-transferasi terminale (TdT) che aggiunge nucleotidi in maniera casuale nelle regioni di giunzione. Se il riarrangiamento è avvenuto "in frame", la catena β viene espressa sulla superficie delle cellule T in associazione ad una pre- α , insieme al CD3 e la catena ζ a formare il precettore TCR (Goldrath AW. and Bevan MJ. 1999).

La funzione del complesso pre TCR è fondamentale nello sviluppo dei linfociti T, esso infatti media la sopravvivenza delle cellule DN e contribuisce alla grandissima espansione proliferativa che avviene durante lo sviluppo delle cellule T. Segnali provenienti dai recettori DN fanno iniziare la ricombinazione al locus della catena α (Lind EF. et al., 2001).

Nella fase successiva i timociti esprimono sia CD4 che CD8, (timociti doppio positivi DP), ed anche il recettore per le chemochine CCR7 che le guida dalla corteccia alla midollare dove le cellule stromali secernono chemochine specifiche per questo recettore. Il riarrangiamento dei geni della catena α del TCR e l'espressione di eterodimeri $\alpha\beta$ si verificano nella popolazione $CD4^+$ e $CD8^+$ subito prima o durante la migrazione dei timociti nella corticale midollare, quando l'espressione tardiva del gene Rag nello stadio pre-T promuove la ricombinazione del gene α .

L'espressione del gene TCR α nello stadio doppio positivo porta alla formazione del TCR $\alpha\beta$ completo, che è espresso sulla superficie cellulare in associazione con il CD3 e la catena ζ (Starr TK. et al.,2003).

A questo stadio i progenitori linfoidi vanno incontro a processi di selezione positiva e negativa. Questi due processi sono necessari per un corretto funzionamento dei linfociti e si basano rispettivamente sul riconoscimento delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) e sul riconoscimento del complesso MHC-peptide self (Starr TK. et al.,2003).

Selezione positiva

Nella zona corticale timica avviene la selezione positiva dei cloni T con recettore $\alpha\beta$ dotato di bassa affinità per peptidi self associati a molecole MHC di classe I o di classe II espresse dalle cTECs (Bousso P. et al., 2002). Solo il 3-5% dei timociti sopravvive a questa selezione e procede verso un'ulteriore selezione (selezione negativa) (Egerton M. et al.,1990), (Goldrath AW. and Bevan MJ.,1999).

I timociti $CD4^+ CD8^+$ sono destinati a morire nel giro di pochi giorni e soltanto l'interazione con molecole MHC è in grado di generare un segnale di salvataggio che consente loro di sopravvivere. I T linfociti che sono stati salvati dal contatto con antigeni MHC di classe I, saranno d'ora in poi in grado di riconoscere solo antigeni non-self associati a MHC di classe I e diventeranno T citotossici $CD8^+ /CD4^-$, per

converso i timociti salvati dal contatto con MHC di classe II diventeranno T helper $CD4^+/CD8^-$ in grado di riconoscere solo antigeni non-self associati a MHC di classe II.

I cloni T che non hanno affinità alcuna per le molecole di istocompatibilità del self perché hanno riarrangiato un TCR non funzionale vengono eliminati per apoptosi (Zijlstra M. et al.,1990), (Cosgrove D.et al., 1991), (Grusby MJ.et al., 1991), (Starr TK. et al., 2003).

I peptidi associati alle molecole MHC sulle cTEC svolgono sicuramente un duplice ruolo: promuovono l'espressione stabile sulla superficie delle cellule timiche delle molecole MHC e influenzano la specificità dei linfociti T selezionati. Ovviamente il timo non può contenere tutti gli antigeni a cui un individuo può rispondere, infatti peptidi estranei non possono essere coinvolti nella selezione positiva, di conseguenza la selezione si basa solo sul riconoscimento di peptidi self. Questo ha portato all'osservazione che lo specifico riconoscimento antigenico e non semplicemente il riconoscimento delle MHC, svolga un certo ruolo nella selezione positiva (Abbas AK et al., 2010).

Un riconoscimento debole o una scarsa avidità verso i peptidi self nel timo protegge i linfociti T immaturi dalla via della morte apoptotica e consente alle cellule di completare la loro maturazione.

Selezione negativa

Successivamente si verifica un processo altrettanto importante di selezione negativa con eliminazione dei cloni T dotati di elevata affinità per le MHC, si tratta di un meccanismo essenziale per garantire la tolleranza nei confronti del self.

La selezione negativa può avvenire allo stadio di cellule doppio positive nella giunzione cortico-medullare o di singolo positive appena formate nella midollare, ma recenti studi hanno dimostrato che può avvenire anche a livello della zona corticale, anche se la midolla rimane il sito d'eccellenza per la delezione dei cloni T autoreattivi (Hogquist KA. et al.,2005), (Kyewski B and Klein L. et al., 2006).

Infatti gli autoantigeni circolanti vengono a contatto con i timociti soprattutto a livello della giunzione cortico-midollare e midollare ove abbondano le cellule dendritiche interdigitate e mTEC che sono in grado di rielaborare l'antigene e di esprimerlo sulla membrana in associazione con le molecole MHC. I peptidi presenti nel timo sono peptidi self derivati da proteine ampiamente espresse nell'organismo. Nei linfociti T maturi la conseguenza del riconoscimento antigenico ad elevata affinità causa morte cellulare. Quindi l'interazione con mTEC con l'eliminazione di cloni autoreattivi costituisce il meccanismo più importante della tolleranza centrale perché assicura che il sistema immunitario non risponda agli antigeni self.

Non sono ancora ben chiari quali siano i meccanismi che inducono la morte apoptotica quando il TCR si lega con elevata affinità all'antigene. Una proteina pro-apoptotica Bim, indotta dall'attivazione del TCR, svolge probabilmente un ruolo

importante nell'indurre l'alterazione della permeabilità della membrana mitocondriale che determina l'apoptosi dei timociti nella selezione negativa (Abbas AK et al., 2010).

Le cellule proseguono maturando in linfociti T $CD4^+$ o $CD8^+$, timociti singolo positivi, (DS). Questa maturazione fenotipica è accompagnata da una maturazione funzionale. Le cellule $CD4^+$ acquisiscono sia la capacità di produrre citochine che inibiscono la risposta a successive stimolazioni antigeniche sia di esprimere molecole effettrici che aiutano i linfociti B e i macrofagi. Le cellule $CD8^+$ divengono, per contro, capaci di produrre molecole ad attività citotossica. I timociti maturi singolo-positivi entrano nella midollare del timo e quindi lasciano il timo per popolare i tessuti linfoidei secondari (Ardavin C., 1997), (Farr AG. and Rudensky A. 1998).

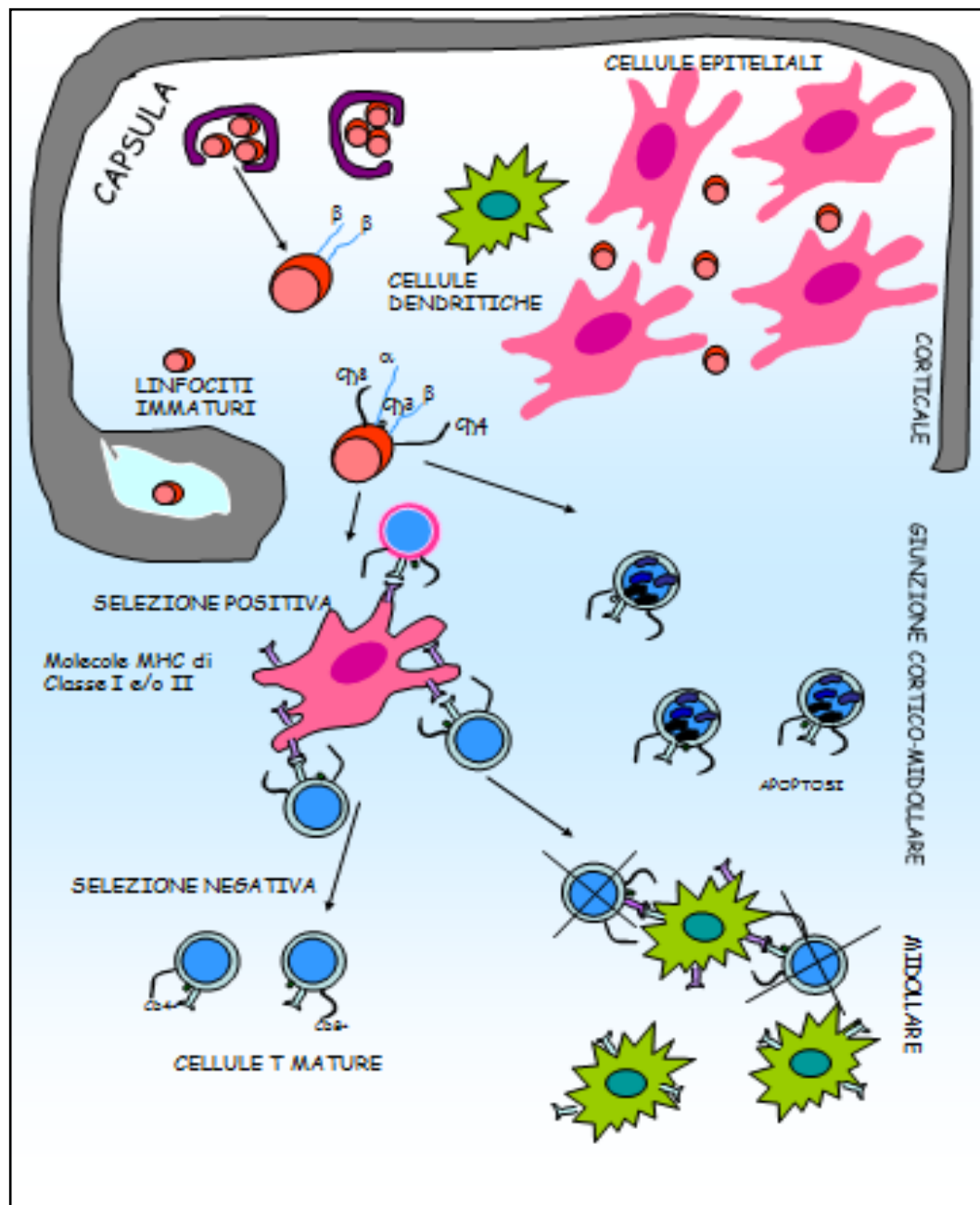


Fig. 4: *Maturazione dei T linfociti e meccanismo di selezione positiva e negativa.*

mTEC

Una particolare funzione è svolta dalle cellule medullari epiteliali mTEC nella selezione negativa dei timociti autoreattivi, attraverso l'espressione promiscua di geni (pGE) che codificano antigeni periferici tessuto-specifici (Linsk R. et al., 1989).

Inizialmente l'espressione ectopica di antigeni periferici nel timo non era considerato un processo importante. Tuttavia negli ultimi anni le è stata riconosciuta una funzione rilevante nell'induzione della tolleranza delle cellule T (Heath WR. et al.,1992), (von Herrath MG. et al.,1994), (Jolicoeur C. et al.,1994).

L'analisi dell'espressione dei geni promiscui nelle mTEC ha dimostrato come questo fenomeno sia altamente conservato nell'evoluzione. Le mTEC over-esprimono un elevato set di geni, (>400), inclusi gli antigeni tessuto specifici, e i geni implicati nello sviluppo di neoplasie. Molti di questi geni codificano per proteine che sono conosciute come target di autoanticorpi in malattie autoimmuni, come l'insulina, acido glutamico e decarbossilasi (GAD65 e 67) nel diabete di tipo I o la perossidasi tiroidea e la tireoglobulina nella tiroidite autoimmune o come infine la mielina basica nella sclerosi multipla(Gotter J. et al.,2004).

Questa proprietà delle cellule mTEC è mantenuta durante tutto il periodo di funzionalità del timo, tutto ciò facilita l'induzione della tolleranza agli antigeni self i quali altrimenti rimarrebbero "imprigionati" dal sistema immunitario (Gotter J. et al., 2004), (Gotter J. and Kyewski B. 2004).

Non solo le mTEC sono in grado di esprimere TSA ma una bassa espressione è presente anche in altre APC timiche anche se il loro ruolo nella delezione dei cloni autoreattivi non è ancora chiaro. Sembra che le cellule dendritiche timiche più che presentare gli antigeni espressi endogenamente, siano in grado di acquisire gli antigeni self dalle mTEC e di presentarli alle cellule T (Zhang M. et al.,2003), (Gallegos AM. et al., 2004), (Kyewski B. and Klein L. 2006). Sembra che questo possa avvenire in diversi modi: le DC cross-presentano efficientemente frammenti antigenici derivati da cellule epiteliali timiche apoptotiche; oppure l'acquisizione degli antigeni sulle DC può derivare dagli esosomi secreti dalle mTEC.

E' stato infine dimostrato un flusso antigenico intercellulare attraverso le gap-junction. Infatti è possibile che le DC periferiche prendano gli antigeni self periferici e migrino nel timo per aumentare così il pool di TSA da presentare per lo sviluppo delle cellule T (Bonasio R. et al., 2006).

Le mTEC possono essere suddivise in due subpopolazioni attraverso i livelli di espressione di molecole costimolatorie (CD80, CD86, MHCII) che vengono espresse durante la loro maturazione.

Le mTEC^{high} sono quelle più mature, mostrano un' alta espressione di molecole costimolatorie ed esprimono anche un ampio e numeroso pool di antigeni (Derbinski J. et al.,2005). Il gene AIRE, l'unico regolatore trascrizionale trovato ad oggi coinvolto direttamente nell'espressione promiscua di geni, modula la

trascrizione di 200-1200 geni, ed è espresso solo nelle mTEC^{high} (Derbinski, J. et al., 2005).

Lo sviluppo delle mTEC è stato un processo controverso negli anni passati. A tutt'oggi vengono postulati due diversi modelli di sviluppo (Fig. 5). I modelli proposti sono compatibili con l'evidenza che dimostra una persistente presenza di progenitori bipotenti nel timo anche in età adulta (Bleul CC. et al., 2006). Infatti è stato dimostrato, in vitro, sotto certe condizioni (Jenkinson W. et al., 2008) che l'atrofia timica può essere reversibile e l'architettura timica può essere ripristinata. Questo dimostra l'elevata plasticità delle TEC nel microambiente timico e supporta l'idea che i progenitori TEC siano sempre presenti e possano essere attivati a proliferare e a differenziare per tutta la vita. Nel primo modello il progenitore bipotente si autorigenera continuamente durante la vita timica e dà origine ad altri due progenitori cTEC e mTEC che successivamente daranno origine alle mTEC e alle cTEC mature. Nel secondo modello sono invece i progenitori mTEC e cTEC che si autorigenerano continuamente (Anderson G. et al., 2007).

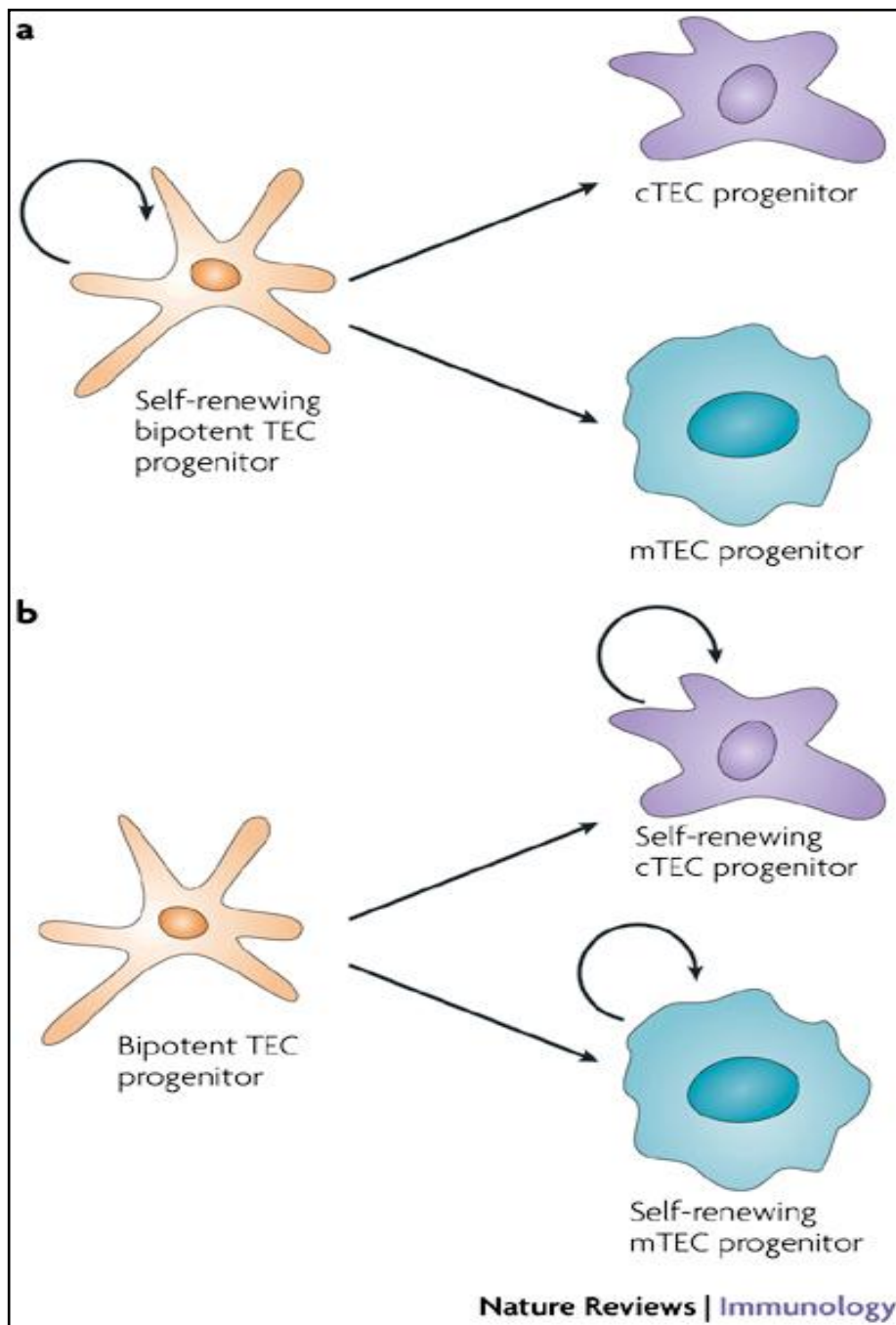


Fig.5: I due modelli di sviluppo delle mTEC. (Anderson G. et al., *Nature Reviews Immunology* 2007).

TOLLERANZA PERIFERICA

Esistono, però numerosi cloni di linfociti maturi che sfuggono al processo di selezione negativa per mancanza di contatto con gli autoantigeni e che sono quindi potenzialmente autoreattivi. Ciò nonostante, quando questi cloni incontrano il rispettivo autoantigene a livello periferico la loro risposta è impedita o fortemente regolata, suggerendo in tal modo l'esistenza di meccanismi che consentono il mantenimento della tolleranza al "self" anche nei confronti degli autoantigeni presenti solo in periferia. Secondo l'attuale nomenclatura la tolleranza periferica si può dividere in tolleranza periferica "T cell" estrinseca ed intrinseca (Walker LS. and Abbas AK. 2002).

Meccanismo estrinseco

La tolleranza periferica estrinseca nei confronti dei linfociti T autoreattivi può verificarsi attraverso tre meccanismi principali. Tali meccanismi sono: l'anergia, la delezione, la soppressione dei linfociti T. Non è noto quale dei diversi meccanismi concorra prevalentemente al mantenimento della tolleranza agli antigeni self o se tutti i diversi meccanismi funzionali agiscano in concomitanza per prevenire pericolose manifestazioni autoimmuni.

L'anergia clonale si verifica quando il linfocita T maturo incontra il peptide specifico nella nicchia del complesso MHC di una cellula presentante (APC), la quale

sia priva delle molecole co-stimolatorie. È, infatti, accertato che l'attivazione linfocitaria avviene solamente in seguito ad un doppio segnale, rappresentato dall'interazione tra recettore linfocitario e antigene (primo segnale) e dall'interazione della molecola CD28 con le molecole co-stimolatorie B7 (secondo segnale). L'arrivo del primo segnale, ma non del secondo, determina nel linfocita uno stato di non responsività funzionale verso successivi stimoli da parte dello stesso antigene, anziché uno stato di attivazione (Schwartz RH. 2003).

Questo è il meccanismo principale della selezione negativa dei linfociti T in fase extratimica che consiste in effetti in una delezione funzionale e non fisica come quella che avviene nella sede timica (Rocken M. and Shevach EM. 1996), (Gao Y. 1998).

La delezione clonale dei linfociti T maturi si verifica in genere in seguito alla persistente stimolazione da parte dell'antigene, che risulta in un processo noto come morte cellulare indotta dall'attivazione ("activation-induced cell death" - AICD). La AICD è una forma di apoptosi indotta da segnali che originano da recettori "di morte" presenti sulla membrana, il più importante dei quali è Fas (Watanabe-Fukunaga, R. et al.,1992). Il ligando del Fas (FasL), interagendo con Fas, attiva nella cellula una serie di cistein-proteasi intracellulari, chiamate caspasi, che determinano la morte apoptotica della cellula. Le cellule in apoptosi vengono rapidamente rimosse dai fagociti e quindi non inducono fenomeni infiammatori. L'effetto finale è una delezione dei linfociti T specifici per l'antigene che ha provocato la loro

stimolazione ripetuta (Van Parijs L. and Abbas, AK. 1998), (Lenardo M. et al., 1999), (Hildeman DA.:et al 2003).

Meccanismo intrinseco

Alcune risposte immunitarie verso autoantigeni sono inibite da linfociti e DC che producono citochine capaci di bloccare l'attivazione e le funzioni dei linfociti T effettori (Walker LS. and Abbas AK. 2002).

Le DC nei tessuti periferici si trovano normalmente in uno stato di riposo ed esprimono bassi o nulli livelli di molecole costimolatorie. Esse sono coinvolte nel mantenimento della tolleranza attraverso l'interazione con i linfociti soppressori, sembra infatti che le Dc promuovano la maturazione di queste cellule (Hubert P. et al.,2007).

I linfociti T regolatori sono stati descritti per la prima volta nel 1960, ma la loro funzione è rimasta sconosciuta per molto tempo (Nishizuka Y. and Sakakura T. 1969). Attualmente gli viene riconosciuto il ruolo di linfociti regolatori (Tregs). Queste cellule sopprimono l'attivazione e la proliferazione dei linfociti T autoreattivi presenti nella periferia (Sakaguchi S. et al.,2004).

La maggior parte di queste cellule esprime elevati livelli della catena α (CD25) (Sakaguchi S. et al.,1995) e del fattore di trascrizione Foxp3 (Fontenot JD. et al., 2003), (Hori S. et al., 2003), (Sakaguchi S. et al.,2004). La loro sopravvivenza è regolata dalle citochine TGF- β e dall'interleuchina 2 e da molecole costimolatorie

come CD28 (Bluestone JA. et al., 2003), (Chen W. et al., 2003), (Shevach EM. et al., 2008).

Le cellule Tregs si sviluppano nella medulla timica in seguito al riconoscimento di antigeni self e nonostante abbiano un'alta affinità sfuggono alla selezione negativa attraverso l'espressione di Foxp3 (Watanabe N. et al., 2005).

Uno dei modelli proposti per lo sviluppo delle cellule Tregs prevede che in un primo tempo esse riconoscano il peptide self con un'alta affinità seguito dall'espressione sulla superficie cellulare di vari cofattori (CD25). Infine l'espressione del gene Foxp3 protegge dalla selezione negativa (Liston A. and Rudensky, AY. 2007).

Mutazioni del gene FoxP3 nell'uomo sono responsabili di una rara malattia autoimmune, associata alla mancanza di cellule T regolatorie, chiamata IPEX (Immune dysregulation Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked syndrome).

Non è ancora chiaro come queste cellule prevengano la risposta immunitaria. Uno dei meccanismi attraverso cui queste cellule controllano la risposta immunitaria è rappresentato dalla secrezione di citochine con azione immunosoppressiva come IL-10 che inibisce la funzione dei macrofagi (Wing K. et al., 2006).

Malattie autoimmuni

Sulla base delle considerazioni sopra esposte, appare chiaro che sia la deficienza che l'alterazione dei meccanismi normalmente responsabili del mantenimento della tolleranza possono determinare una risposta del sistema immunitario nei confronti del "self" e quindi provocare l'insorgenza di fenomeni di autoimmunizzazione.

Tale potenzialità esiste in tutti gli individui, in quanto i linfociti di tutti gli individui esprimono recettori specifici per autoantigeni ed in quanto molti autoantigeni sono facilmente accessibili alle cellule del sistema immunitario. Poiché i meccanismi fondamentali per lo sviluppo e il mantenimento della tolleranza al "self" sono rappresentati dalla eliminazione dei linfociti immaturi che incontrano gli autoantigeni durante il loro processo di sviluppo (selezione negativa) e dalla delezione o inattivazione funzionale dei linfociti maturi che incontrano autoantigeni nel corso della vita. La perdita della tolleranza nei confronti degli autoantigeni può essere, dunque, la conseguenza sia di una selezione anomala dei linfociti autoreattivi, cioè di un difetto della tolleranza centrale, sia di alterazioni della presentazione degli autoantigeni alle cellule del sistema immunitario, cioè di un'anomalia della tolleranza periferica (Abbas AK et al., 2010).

La prevalenza delle malattie autoimmuni è stimata intorno al 5-7% nella popolazione generale (Marrak P. et al., 2001). Di solito sono malattie croniche,

gravemente invalidanti, che necessitano di una terapia farmacologica immunosoppressoria. Normalmente i fenomeni autoimmuni colpiscono più le donne degli uomini (Lleo A. et al 2008).

Le malattie autoimmuni vengono suddivise in due grandi categorie: sistemiche e organo specifiche (Davidson, A. and Diamond, B. 2001).

Le malattie autoimmuni sistemiche sono caratterizzate da una risposta immune diretta contro antigeni-self ubiquitari, causando la distruzione di un ampio "range" di tessuti. Ne sono un esempio il lupus eritematoso sistemico (SLE) e la sindrome di Sjogren nelle quali vengono colpiti i tessuti renali, cerebrali ed epidermici (Coppo P. et al., 2003).

Le malattie sistemiche organo specifiche vengono ulteriormente suddivise in due subcategorie: distruttive e non distruttive.

Le distruttive organo-specifiche indirizzano la risposta immunitaria verso specifici organi o tipi cellulari. Un esempio sono il Diabete di tipo I a cellule beta dove vengono colpite le isole di Langherans pancreatiche (Marrak P. et al., 2001) o la Tiroidite di Hashimoto e il morbo di Graves nei quali viene colpita la ghiandola tiroidea. Molti e vari organi possono essere colpiti ma gli organi endocrini risultano essere più suscettibili di altri, anche se la causa è poco conosciuta. La tiroide, il pancreas, il surrene sono un esempio di organi maggiormente colpiti dalle malattie autoimmuni in Europa (Anderson MS. 2002).

Le malattie non distruttive sono caratterizzate dalla produzione di autoanticorpi che interferiscono con la funzionalità degli organi senza però causarne distruzione (Gazda LS. et al., 1995). Un esempio è la Miastenia *gravis*.

Molto spesso infatti i fenomeni autoimmuni si accompagnano alla presenza in circolo di autoanticorpi cioè di anticorpi rivolti verso gli antigeni-self (Lacroix-Desmazes S. et al., 1998).

Il ruolo eziopatogenetico degli autoanticorpi è noto per poche patologie, nella maggior parte dei casi essi rappresentano soltanto un utile presidio o complemento diagnostico e prognostico della malattia.

 Riassumendo, le malattie autoimmuni possono essere dovute ad un “errore” del sistema immunitario, il quale dirige le proprie potenzialità offensive contro tessuti propri dell’organismo anziché contro gli agenti infettivi.

Le cause possono dipendere da numerosi fattori: esposizione di antigeni normalmente sequestrati nei tessuti in seguito a distruzione degli stessi; anomalie funzionali dei linfociti T e B, inappropriata espressione di molecole di classe II del complesso maggiore di istocompatibilità (di norma sulla superficie delle cellule bersaglio gli autoantigeni sono esposti unitamente a molecole di classe I).

Malattie autoimmuni monogeniche

Generalmente le malattie autoimmuni sono causate prevalentemente da effetti combinatori di più geni e fattori ambientali. Sono poche invece le malattie ad eziologia monogenica fin'ora descritte (Ulmanen I. et al., 2005). Oltre all'APECED vi sono l'ALPS l'IPEX e la "2R α deficiency".

ALPS (OMIM 601859) è una patologia autosomica dominante caratterizzata dall'accumulo di linfociti T doppio negativi, citopenia e suscettibilità allo sviluppo di tumori (Strauss SE. et al.,1999).

Attraverso studi sul modello murino è stato possibile identificare il gene responsabile si tratta del TNFRSF6 (FAS) gene, la cui proteina partecipa a fenomeni apoptotici. Non tutti i pazienti con ALPS hanno mutazioni nel gene TNFRSF6 (FAS). Sono state trovate, infatti mutazioni in geni che codificano per le caspasi 8 o 10 o altri ligandi del FAS. Si tratta comunque di proteine coinvolte nel "patway signalling "di Fas utilizzato nella morte cellulare programmata (Chun HJ. et al., 2002), (Walsh et al 2003).

L'apoptosi è un elemento importante nel sistema immunitario che regola l'omeostasi dei linfociti, la tolleranza verso il self e la terminazione della risposta immunitaria.

Un difetto nelle proteine che appartengono al patway FAS, così come nei pazienti ALPS porta ad una apoptosi inefficiente con accumulo di linfociti negli organi linfoidi

e di cloni T autoreattivi che non vengono eliminati in maniera efficace (Kischkel FC. et al., 1995).

L'IPEX (OMIM 304790) è una patologia ad ereditarietà X-linked, causata da mutazioni nel gene FOXP3. Ha un fenotipo variabile e grave che in alcuni casi può portare anche alla morte. Il fenotipo più comune include diabete di tipo I, enteropatia grave, ipotiroidismo (Powell BR et al.,1982).

Il fenotipo di questa patologia ha suggerito un difetto nelle cellule Tregs infatti studi su modelli murini hanno indicato che Foxp3 è necessario per lo sviluppo delle Tregs (Fontenot JD. et al.,2003), (Hori S. et al., 2003) (Khattari R. et al .,2003).

La "2R α deficiency" è dovuta ad anomalie della tolleranza periferica e' una rara sindrome caratterizzata da una grande varietà di sintomi immunologici e autoimmuni. Il 2R α o CD25 è un fattore importante per le Treg (Sakaguchi S. et al., 2005). Infatti la mancanza di questo fattore impedisce alle cellule Treg di mantenere la tolleranza periferica. Questo determina nei pazienti 2R α deficiency lo sviluppo di fenomeni autoimmuni (Sharfe N., et al., 1997), (Roifman CM. (2000), (Caudy AA., et al., 2007).

APS1

L'APS1 o APECED (OMIM 240300) appartiene ad un gruppo di malattie chiamate sindromi autoimmuni poliendocrine (APS). Nonostante l'eterogeneità di questo gruppo di sindromi, esse presentano delle caratteristiche comuni, poiché i pazienti soffrono di diverse manifestazioni autoimmuni organo-specifiche che colpiscono in genere gli organi endocrini. Il termine APECED significa Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy e riflette le caratteristiche cliniche dei soggetti affetti (Neufeld M. et al., 1980), (Perheentupa J. et al., 1980), (Neufeld M. et al., 1981). La malattia ha un'incidenza bassa nella popolazione generale ma risulta avere un'incidenza maggiore in alcune popolazioni geneticamente omogenee come i Finlandesi dove la frequenza della malattia è di 1:25000 (Perheentupa J., 1972), (Norio R. et al., 1973), negli ebrei askenazi (1:9000) (Zlotogora J. and Shapiro MS. 1992) e nei sardi (1:14500) (Rosatelli MC. et al., 1998). L'APECED è una malattia trasmessa come carattere autosomico recessivo; il quadro clinico e l'evoluzione della malattia è altamente variabile, anche tra soggetti affetti della stessa famiglia. L'età di esordio varia tra l'infanzia e l'adolescenza. I pazienti possono avere una combinazione di oltre 10 differenti sintomi causati dalle reazioni distruttive autoimmuni verso gli organi endocrini e non endocrini. La diagnosi è basata sulla presenza di almeno due dei tre sintomi principali che sono: candidiasi cronica mucocutanea, ipoparatiroidismo e insufficienza adrenocorticale (morbo di

Addison). Tutti i pazienti APECED finlandesi presentano episodi di candidiasi che insorge come primo sintomo nel 60% dei casi. Nella maggior parte delle altre popolazioni la prevalenza della candidiasi associata ad APECED è molto alta (Betterle C. et al., 1998), (Collins SM. et al., 2006), (Stolarski B. et al., 2006), (Wolff AS. et al., 2007) tranne che negli ebrei askenazi dove la candida ha un'incidenza molto bassa (Zlotogora J. and Shapiro MS. 1992). L'infezione da candida può apparire nella bocca, nelle unghie, nell'esofago e intestino e può predisporre al carcinoma squamoso della bocca e dell'esofago. L'ipoparatiroidismo mostra una diversa frequenza legata al sesso, poiché le donne affette da APECED ne sono maggiormente colpite (98 %) rispetto agli uomini affetti (71%) (Gylling M. et al., 2003). Altri sintomi endocrini relativamente comuni includono diabete di tipo I, ipoparatiroidismo e ipogonadismo. Caratteristiche manifestazioni ectodermiche dell'APECED includono alopecia, vitiligine, distrofia delle unghie e dello smalto dentario che è presente nel 77% dei casi (Ahonen P. et al., 1990). L'epatite autoimmune è una seria componente della malattia che può portare ad episodi fulminanti. I pazienti hanno elevati livelli di autoanticorpi tessuto-specifici circolanti. Molti di questi anticorpi sono diretti contro enzimi intracellulari coinvolti nella sintesi degli ormoni a livello degli organi colpiti come le paratiroidi e i surreni (Peterson P. and Peltonen L. 2005). Questi anticorpi sono responsabili della distruzione degli organi target e la loro presenza talvolta correla con le manifestazioni cliniche (Ahonen P. et al., 1987), (Betterle C. et al., 1998), (Betterle C.

et al., 2002). Recentemente anticorpi neutralizzanti contro l'Interferone tipo I (INF), specialmente INF- α e INF- ω sono stati trovati nel siero di pazienti omozigoti per mutazioni del gene AIRE. In alcuni casi gli anticorpi precedono lo sviluppo dei sintomi (Meager A. et al., 2006), (Wolff A. et al., 2007). Nella tabella 1 sono riportate le manifestazioni cliniche dell'APECED e i relativi autoantigeni.

Manifestazioni cliniche	Frequenza %	Antigene
Candidiasi mucocutanea	90-100	
Iposurrelismo	72-80	P450c21,P450c17a,P450sc
Ipoparatiroidismo	79-85	Recettore per il calcio
Diabete di tipo I	0-12	ICA,GAD65,IA-2,IAA
Ipogonadismo	30-60	P450Sc
Ipotiroidismo	4-10	Tireoglobulina, Tireoperossidasi
Gastrite autoimmune	0-13	ATPasi H+/K+
Vitiligine	13-25	SOX9, SOX10,ADDC
Alopecia	40-72	Tiroxina idrossilasi
Malassorbimento intestinale	10-18	Triptofano idrossilasi
Epatite autoimmune	5-12	CYP1A2, CYP2A6,AADC

Tab.1: Manifestazioni cliniche dell'APECED e i relativi auto antigeni.

IL GENE AIRE-AUTOIMMUNE REGULATOR

La sindrome APECED è dovuta a difetti del gene AIRE che mappa sul cromosoma 21 in posizione q22.3 (Consortium, 1997), (Nagamine K. et al., 1997). Esso è costituito da 14 esoni che coprono un intervallo di circa 12 Kb del DNA genomico (Fig.1). Il gene AIRE codifica per la proteina omonima costituita da 545 aminoacidi e avente una massa molecolare di circa 58 kDa.

LE MUTAZIONI CHE CAUSANO APECED

Attualmente sono state descritte più di 60 mutazioni localizzate nel gene AIRE (Human Gene Mutation Database). Le mutazioni interessano le regioni codificanti e includono singole sostituzioni nucleotidiche, piccole inserzioni e delezioni. Sono descritte inoltre mutazioni che colpiscono i siti di splicing. La maggior parte delle mutazioni localizzate nelle regioni codificanti sono mutazioni nonsense che portano alla formazione di un codone prematuro di stop. Non si hanno dati che indichino se tali messaggeri vengano tradotti in proteine tronche o se la maggior parte di questi trascritti non senso vengano degradati attraverso il "nonsense-mediated decay".

Vi sono poi mutazioni missenso nel gene AIRE che sono state utilizzate per stabilire la funzione critica dei vari domini della proteina (Bjorses P. et al., 2000), (Pitkanen J. et al., 2000), (Pitkanen J et al., 2001), (Halonen M. et al., 2004), (Uchida D. et al., 2004), (Pitkanen J.et al., 2005).

Nelle popolazioni isolate in cui l'APECED è relativamente frequente è possibile osservare mutazioni comuni dovute ad un chiaro effetto fondatore. In Sardegna la mutazione R139X rappresenta il 94 % degli alleli mutati nei pazienti APECED (Rosatelli et al., 1998); la frequenza della mutazione R139X nella popolazione generale sarda risulta essere pari all'1,7% mentre nella regione dell'Ogliastra la frequenza raggiunge il 3,4%. (Fig.3). In Puglia invece è la mutazione W78R a rappresentare il 56% degli alleli mutati (Meloni A. et al., 2002). Tutti i pazienti ebrei askenazi invece sono omozigoti per la mutazione Y85C (Zlotogora J. e Shapiro MS. 1992). La più comune mutazione della Finlandia è la R257X (Fig.4). Il 77% dei pazienti finlandesi è omozigote per questa mutazione mentre il 17% è un eterozigote composto (Perheentupa J. 2006). La mutazione R257X è stata identificata inoltre nel 30% dei pazienti non finlandesi (Bjorses P. et al., 2000) e pertanto rappresenta la mutazione più frequente in altre popolazioni europee (Scott et al., 1998); è presente infatti nel 75% degli alleli europei del centro e dell'est e nel 71% degli alleli polacchi (Cihacova D. et al., 2001), (Stolarski B. et al., 2006). Un'altra mutazione particolarmente frequente è la delezione di 13 bp (c967-979 del 13bp) localizzata nell'esone 8. Essa è presente nell'82% degli Irlandesi, nel 70 % dei Britannici, nel 53 % dei Nord Americani e nel 48% dei Norvegesi (Pearce SH. et al., 1998), (Scott HS. et al., 1998), (Wang CY. et al., 1998a), (Heino M. et al., 1999b), (Bjorses P. et al., 2000), (Dominguez M. et al., 2006;), (Wolff AS. et al., 2007) (Fig.6). L'identificazione di mutazioni nel gene AIRE ne facilita la diagnosi clinica.

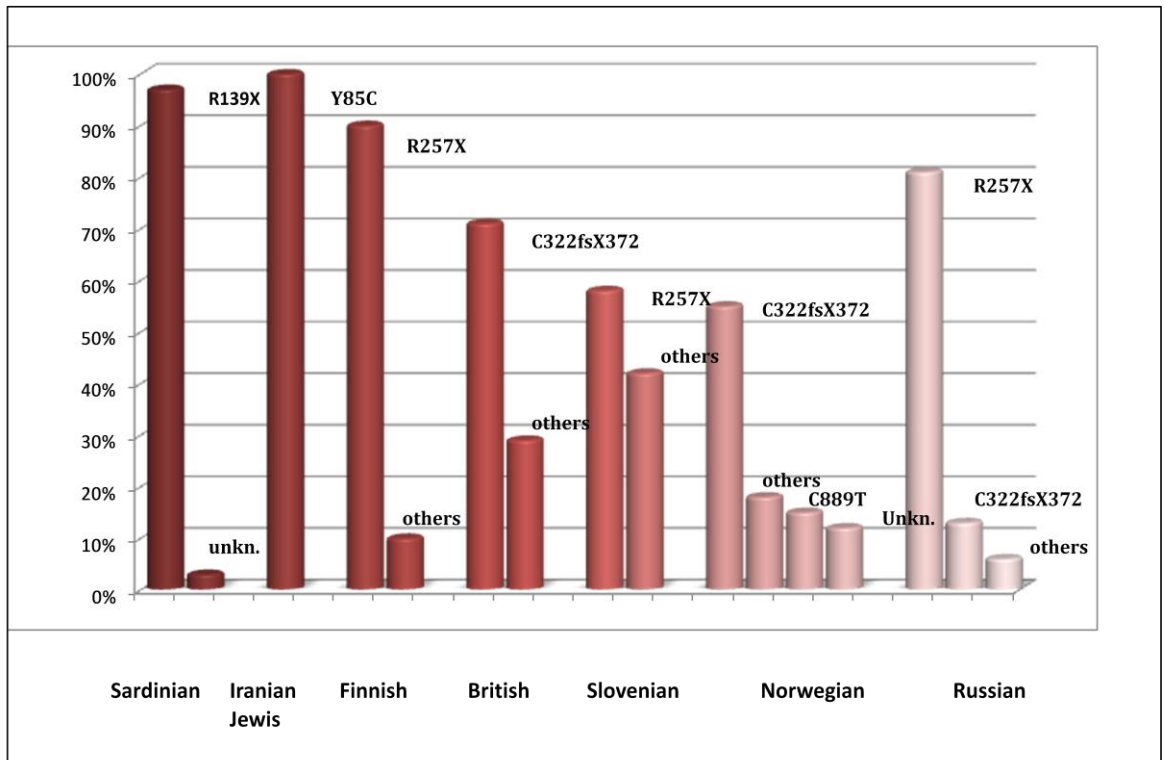


Fig 6: Distribuzione delle mutazioni APECED in Europa.

CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO E ASSOCIAZIONE CON IL SISTEMA HLA.

Non esiste una evidente correlazione tra genotipo e fenotipo nei pazienti APECED. In una serie di 104 pazienti Finlandesi, Italiani, Svedesi, e Norvegesi, la sola associazione statistica significativa è stata trovata tra l'assenza della mutazione R257X e la diminuzione della frequenza della candidasi muco cutanea (Halonen M. et al., 2002). Inoltre i pazienti APECED di origine ebrea ashkenaza che possiedono esclusivamente la mutazione Y85C non sono affetti da candida (Zlotogora J. and Shapiro MS. 1992). La variabilità dei sintomi, la severità della malattia e la varietà degli organi colpiti suggerisce che oltre al gene AIRE altri fattori genetici e ambientali contribuiscano al fenotipo della malattia. Nei comuni disordini autoimmuni, polimorfismi genetici del sistema HLA codificanti per le molecole del MHC (sistema maggiore di istocompatibilità) sono spesso associati al rischio di manifestare la malattia. Nell'APECED è stato dimostrato che i singoli alleli della classe II dell'HLA modificano il fenotipo. L'associazione maggiormente definita riguarda l'alopecia, il morbo di Addison e il diabete di tipo I. Gli stessi alleli sono stati trovati in associazione con queste malattie in pazienti non APECED (Halonen M. et al., 2004).

PROTEINA AIRE

La proteina AIRE è costituita da numerosi domini strutturali che sono tipici di proteine che svolgono il ruolo di regolatori trascrizionali (Consortium, 1997; Nagamine K. et al., 1997) (Fig. 7). Tutti i domini predetti di AIRE sono conservati nel topo (Blechsmidt K. et al., 1999), (Mittaz L. et al., 1999), (Wang CY. et al., 1999). Sia la proteina AIRE endogena che quella espressa transientemente in cellule di mammifero si trova localizzata nel nucleo, dove si distribuisce sotto forma di corpi nucleari, i cosiddetti Nuclear Body (NBs) anche noti come ND10, che si associano con la matrice nucleare delle cellule e rappresentano un esempio delle più studiate strutture subnucleari.

L'integrità di tali strutture è alterata in alcune gravi patologie e la loro disgregazione (talvolta reversibile) è associata alla perdita del controllo trascrizionale di alcune proteine come p53, Laf-1, Daxx, che costituiscono o sono strettamente associati con gli ND10. (Akiyoshi H. et al., 2004), (Ilmarinen T. et al., 2005), (Tao Y. et al., 2006). Quando AIRE viene espressa transientemente in cellule in coltura è possibile osservarne anche la localizzazione citoplasmatica sotto forma di filamenti e/o microtubuli e aggregati di varia grandezza (Bjorses P. et al., 1999), (Rinderle C. et al., 1999). La porzione N-terminale di AIRE che comprende gli aminoacidi 101-141 è in grado di dirigere la proteina GFP all'interno del nucleo, questo dato supporta l'esistenza di un segnale di localizzazione nucleare (NLS)

all'interno di questa regione (Pitkanen J. et al., 2001). Oltre al segnale NLS, AIRE possiede un potenziale segnale di esporto nucleare (NES) localizzato nel dominio HSR (Homogeneously Staining Region) (Pitkanen J. et al., 2001). La proteina AIRE possiede diversi domini comuni alla famiglia delle proteine Sp100 (Speckled protein 100 kDa). Le proteine Sp100 interagiscono con diversi regolatori trascrizionali e sono coinvolte sia nell'attivazione trascrizionale che nella repressione (Bloch DB. et al., 2000), (Wasylyk C. et al., 2002), (Moller A. et al., 2003), (Ling PD. et al., 2005), (Yordy JS. et al., 2005). Il dominio HSR, che mappa nella regione NH2 terminale, è presente anche in tutte le varianti di splicing di Sp100, in cui media l'omodimerizzazione (Sternsdorf T. et al., 1999). Anche il dominio HSR di AIRE media l'omodimerizzazione e la fosforilazione sembrerebbe coinvolta in questo processo dal momento che AIRE omodimerizza spontaneamente in vitro dopo fosforilazione da parte di cAMP protein kinasi C o A dipendente (Kumar PG. et al., 2001).

Recentemente attraverso studi di "computer modeling" ed analisi di omologia di sequenza, il dominio HSR è stato meglio caratterizzato e rinominato dominio CARD (CAspase ReCRuiment Domain). Il CARD dominio è un motivo strutturale tipico del reclutamento delle caspasi ed appartiene ad una classe di motivi proteici strutturali denominati Death Fold che mediano le interazioni proteina-proteina nel processo apoptotico.

Numerose mutazioni sono state descritte nel dominio HSR/CARD della proteina AIRE e molte di queste aboliscono l'omodimerizzazione indicando che tale processo

è estremamente importante per una corretta funzione della proteina (Halonen M. et al., 2004), (Meloni M. et al., 2005). Mutazioni missenso che causano l'APECED alterano la struttura dell'HSR domain e talvolta distruggono la capacità transattivante della proteina, disturbano il processo di localizzazione di AIRE sotto forma di nuclear bodies e la sua localizzazione in complessi ad alto peso molecolare (Halonen M. et al., 2004). Il SAND domain (Sp100, AIRE, NucP41/75, DEAF-1) è un altro dominio presente sia in AIRE che in diversi membri della famiglia Sp100. Questo dominio è caratteristico delle proteine coinvolte nella regolazione trascrizionale cromatino-mediata e contiene una sequenza altamente conservata KDWK che non è però presente in AIRE (Gibson TJ. et al., 1998). Tale sequenza media il legame con il DNA in Sp100b, NUDR (Nuclear DEAF-1 related) e in GMEB-1 (Bottomley MJ. et al., 2001), (Surdo PL. et al., 2003). La struttura tridimensionale del SAND domain è stata ricostruita a partire dal SAND di Sp100b e GMEB-1 (glucocorticoid-modulatory element binding 1). La presenza di residui idrofobici conservati fanno supporre che il dominio SAND abbia un ripiegamento globulare, formato da otto β foglietti e da alcuni residui carichi positivamente, altamente conservati che rivestono un ruolo funzionalmente importante. Nella maggior parte dei domini SAND sono state trovate ulteriori cariche positive in sequenze adiacenti al motivo conservato, la cui funzione è quella di consentire un'interazione non specifica con i gruppi fosfato del DNA.

AIRE possiede due domini PHD (“plant homeodomain”) finger localizzati nelle due estremità della proteina. La loro presenza deporrebbe per un coinvolgimento di AIRE nella regolazione trascrizionale dal momento che questi domini sono stati trovati spesso in fattori regolatori della cromatina. Si tratta di domini contenenti circa 60 aminoacidi che possiedono una struttura simile al RING finger domain, infatti entrambi contengono una sequenza conservata definita da un otetto di cisteine e istidine coordinate con due atomi di zinco. Questi PHD hanno una struttura di tipo globulare costituita da due β -foglietti e una α elica. Le regioni contenenti queste strutture secondarie e i residui coinvolti nel coordinamento con lo ione zinco sono molto conservate nelle specie. Le regioni del PHD finger loop I e loop II sono variabili e potrebbero contribuire alla specificità. Quando AIRE è fuso con un DNA-Binding domain di lievito si comporta come un potente transattivatore della trascrizione e in particolare i PHD finger sono importanti per la capacità transattivante della proteina in particolare il PHD2 ha un ruolo predominante rispetto al PHD1 (Bjorses P. et al., 2000), (Pitkanen P. et al., 2001), (Uchida D. et al., 2004), (Meloni A. et al 2008). Mutazioni nel dominio PHD2 infatti, determinano una drastica diminuzione dell’attività trascrizionale della proteina AIRE. E’ stato dimostrato inoltre che i PHD finger di AIRE sono in grado di legare la sequenza consenso ATTGGTTA (Purohit S. et al., 2005). Alcuni studi hanno dimostrato che AIRE possiede attività E3 ubiquitin ligasica ed è in grado di reprimere la trascrizione di alcuni geni che sono partner di CBP (Uchida D. et al., 2004). Tali attività sono

localizzate nel primo PHD finger la cui struttura 3D è stata determinata recentemente e suggerisce che tale dominio possa avere una funzione nelle interazioni proteina-proteina (Bottmley MJ. et al., 2005). Uno studio molto recente descrive attraverso metodi biochimici e biofisici come AIRE e in particolare il suo PHD1, sia in grado di legare selettivamente la lisina 4 (K4) non metilata dell'istone H3. AIRE si lega con H3K4 non metilata sui promotori di antigeni tessuto specifici reclutando altri coattivatori trascrizionali come CBP che sinergicamente portano all'attivazione trascrizionale dei geni target (Org T. et al., 2008).

Alle due estremità della proteina sono situati 4 motivi LXXLL intervallati da una sequenza ricca in prolina che mappa tra i due PHD finger. La sequenza ricca in prolina è stata identificata in diversi fattori di trascrizione e spesso media l'interazione proteina-proteina (Kay BK. et al., 2000). Gli LXXLL sono motivi anfipatici nei quali l rappresenta la leucina e x gli qualsiasi altro aminoacido. Essi sono stati descritti in diverse proteine coattivatrici inclusa Sp110 (Bloch DB. et al., 2000) e mediano il loro legame con i recettori nucleari con conseguente attivazione trascrizionale (Heery DM. et al., 1997), (Savkur RS. and Burriss TP. 2004). Il motivo LXXLL rappresenta un dominio di interazione con i recettori nucleari degli androgeni ed è presente anche nel coattivatore SRC 1a (Steroid Receptor Coactivator), il quale rappresenta la famiglia dei coattivatori della trascrizione maggiormente studiata, chiamata HAT (Histone Acetil Transferasi). SRC-1a non interagisce direttamente con la struttura cromatinica, ma si avvale di altri fattori proteici quali p300-CBP (Creb

Binding Protein) o PCAF (p300/CBP associated factor). Recentemente (Meloni A. et al.,2008) è stato dimostrato che gli LXXLL rappresentano domini di transattivazione per AIRE.

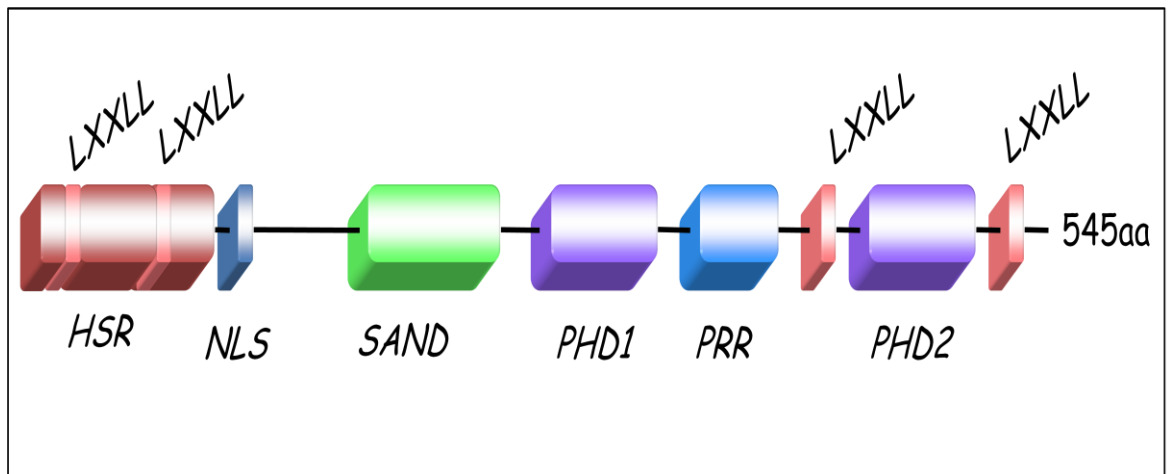


Fig. 7: Rappresentazione dei domini della proteina AIRE.

LA FUNZIONE DI AIRE

AIRE e l'espressione genica promiscua nel timo

L'espressione della proteina AIRE, sia nel topo che nell'uomo è più abbondante nei tessuti immunologicamente più rilevanti, come il timo, i linfonodi e la milza (Bjorses P. et al., 1999), (Heino M et al., 1999a). L'espressione del gene AIRE è stata evidenziata in cellule della linea monocito-dendritica sia nel timo che in periferia (Heino M et al., 1999a), (Kogawa K. et al., 2002), (Sillanpaa N. et al., 2004). Nel topo l'espressione della proteina AIRE è stata rilevata anche in diversi tessuti non immunologici (Halonen M. et al., 2001). Nel timo dove AIRE è abbondantemente espressa troviamo un'espressione localizzata nella medulla e nella giunzione cortico-medullare e in particolare nelle cellule mTEC (Fig.6) (Bjorses P. et al., 1999), (Heino M. et al., 1999a), (Heino M. et al., 2000), (Zuklys S. et al., 2000), (Halonen M. et al., 2001). Poiché le mTEC esprimono un vasto repertorio di antigeni tessuto-specifici (Derbinski J. et al., 2001) e poiché è stato dimostrato che AIRE è in grado, in vitro, di attivare la trascrizione (Bjorses P. et al., 2000), (Pitkanen J. et al., 2001), Klein e collaboratori, e Anderson e collaboratori hanno ipotizzato che AIRE possa regolare la trascrizione ectopica di geni che codificano per antigeni periferici tessuto-specifici nelle cellule mTEC. (Klein L. and Kyewsky B. 2000), (Anderson MS. et al., 2002). Infatti successivi studi di espressione con microarray eseguiti con il topo Aire^{-/-} hanno mostrato che l'espressione di un sostanziale

subset di antigeni tessuto-specifici nelle cellule mTEC viene perduta in assenza di Aire (Anderson MS. et al., 2002), (Derbinski J. et al., 2005). Molti di questi geni codificano per proteine che sono conosciute come target di autoanticorpi nei pazienti APECED, come ad esempio il gene dell'insulina (Gylling M. et al., 2000). Inoltre l'assenza di Aire nel topo causa la quasi completa perdita della capacità di eliminare i linfociti self-specifici nel timo (Liston A. et al., 2003). Esistono diverse evidenze scientifiche che supportano l'ipotesi che le diffuse manifestazioni autoimmuni nei pazienti APECED siano causate dalla mancanza dell'espressione ectopica nel timo che porta susseguentemente alla perdita di tolleranza da parte dei linfociti T verso questi antigeni. Questa ipotesi "affascinante" permetterebbe di spiegare per quale ragione la mancanza di un unico gene determinerebbe effetti così disparati su organi e tessuti (Fig.8 e 9).

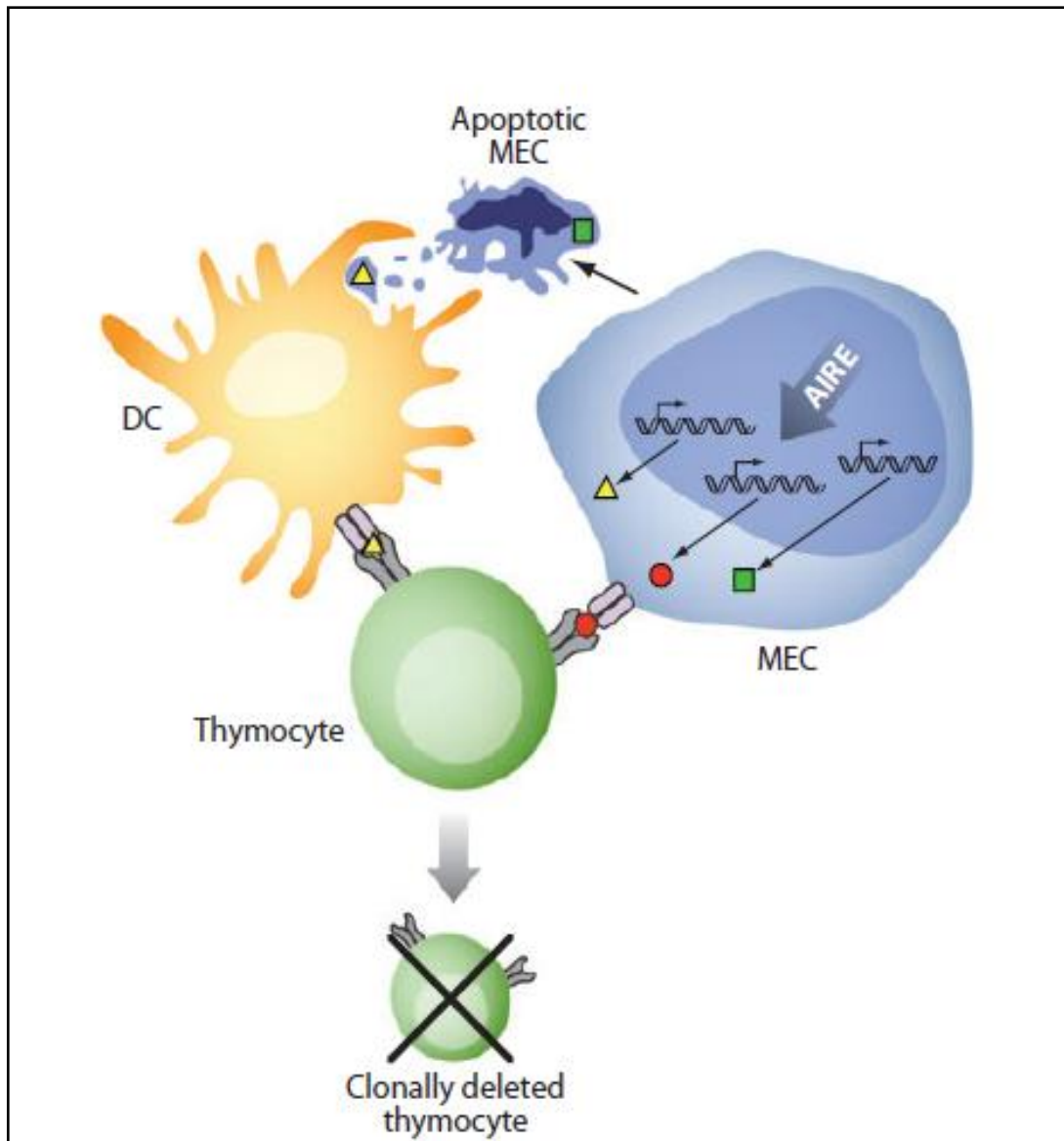


Fig.8: Meccanismo funzionale proposto per la proteina AIRE (Mathis D. and Benoist C. Ann. Rev. Immunol. 2009).

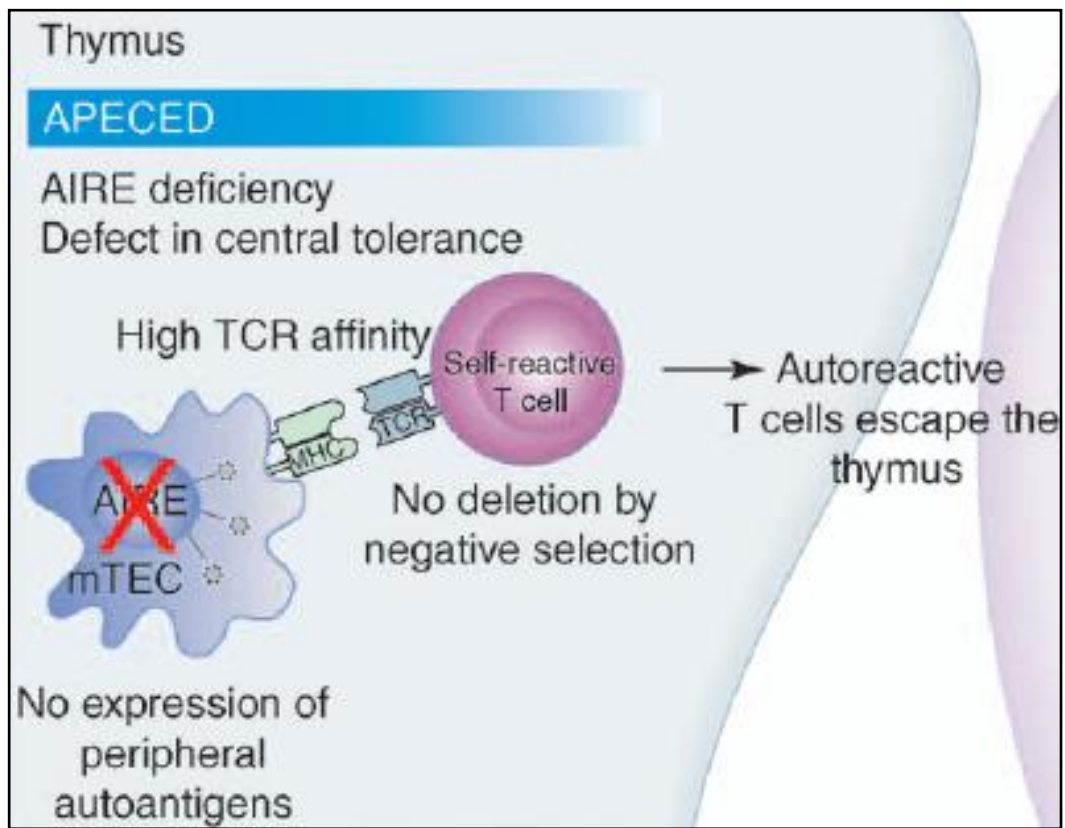


Fig.9: Meccanismo proposto in assenza di AIRE: gli antigeni-self non vengono espressi nel timo e le cellule T autoreattive non sono eliminate e sfuggono dal timo.

Nonostante la proteina AIRE sia espressa primariamente nel timo, è da notare che non tutti gli auto-antigeni per i quali si formano auto-anticorpi sono espressi a livello timico, ciò suggerisce che altri meccanismi sono richiesti per lo sviluppo della tolleranza antigenica.

AIRE è espresso anche nei tessuti linfoidei periferici come linfonodi e tonsille dove probabilmente svolge un fine ruolo regolatorio sull'attivazione dei linfociti T. Studi recenti eseguiti mediante Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) dimostrano inoltre che AIRE lega direttamente i promotori di diversi geni che sono i suoi target "in vivo" e ne regola l'espressione nel timo (Ruan QG. et al., 2007).

RUOLO DI AIRE NELLA PERIFERIA

E' ormai chiaro che AIRE ha un ruolo importante nel meccanismo della tolleranza centrale ma la presenza del trascritto codificante la proteina AIRE nei monociti e nelle DC periferiche, ha portato ad investigare sul ruolo extra timico della proteina, e più specificatamente la sua funzione nella tolleranza periferica.

AIRE potrebbe avere un ruolo nel controllo della tolleranza periferica attraverso l'eliminazione delle cellule T autoreattive sfuggite alla selezione timica.

Sono stati compiuti numerosi studi, soprattutto nel topo per capire meglio questo processo ma varie linee di ricerca sono arrivate alla conclusione che, il contributo di AIRE nell'induzione e nel mantenimento della tolleranza è altamente improbabile

soprattutto per l'espressione della proteina nelle DC che risulta essere molto bassa rispetto a quella della mTEC.

Recentemente sono state identificate nei linfonodi periferici varie cellule nell'interfaccia tra le cellule B e T che esprimono AIRE e mediano la delezione dei cloni T autoreattivi. Questi dati suggeriscono che i tessuti linfonodali periferici agiscono da "rete di protezione" bloccando le cellule T autoreattive per altri antigeni diversi da quelli del timo.

Inoltre è stato dimostrato che il numero di geni che è controllato da AIRE in queste cellule è 1/10 rispetto a quello controllato nel timo. Questi risultati aggiungono ulteriori dubbi sul vero ruolo della proteina nella tolleranza periferica.

MECCANISMO MOLECOLARE DI AIRE

Altre funzioni della proteina AIRE

La regolazione dell'espressione di antigeni tessuto-specifici nella periferia delle mTEC potrebbe non essere l'unica funzione della proteina.

Recentemente vari autori hanno dimostrato che le mTEC che esprimono AIRE sono soggette ad un rapido turnover, suggerendo un ruolo nel induzione dell'apoptosi nelle mTEC e facilitando la cross presentazione degli antigeni self prodotti (Gray D. et al., 2007).

Le mTEC nel timo sono presenti a diversi stadi di sviluppo e questo implica la presenza di un progenitore bipotente nell'adulto.

Recentemente è stato proposto un terzo modello, "terminale differenziativo" per lo sviluppo delle mTEC a partire dal progenitore bipotente: le mTEC immature $CD80^-$ e $AIRE^-$ esprimono sulla superficie il recettore RANK, che interagisce con il suo ligando espresso dalle cellule "lymphoid tissue inducer" LTi ($CD3^- CD4^+$). Questa interazione induce la maturazione delle mTEC $AIRE^+ CD80^+$. Lo sviluppo delle mTEC è accompagnato dall'aumento dell'espressione di TRAF6 permettendo poi alle cellule di poter partecipare al processo di selezione negativa (Fig.10) (Anderson G. et al.,2007).

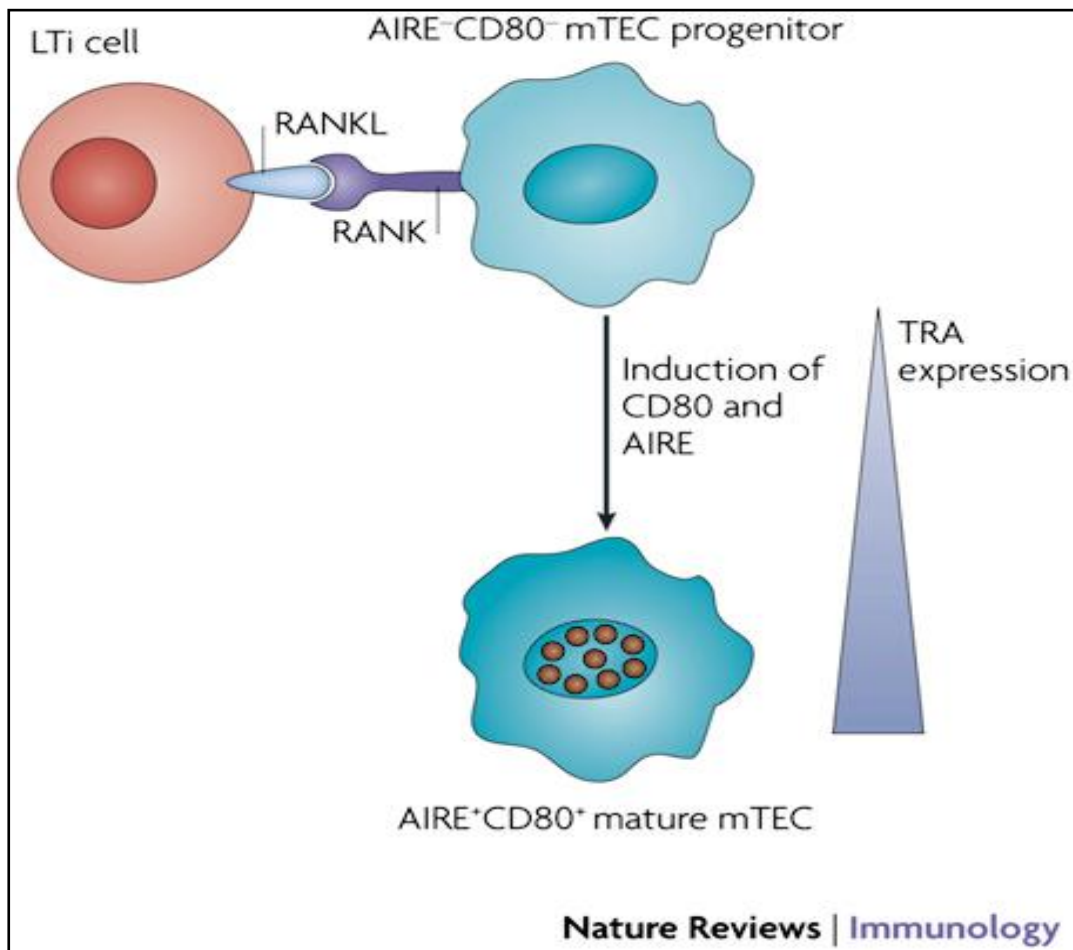


Fig.10: Sviluppo delle mTEC in relazione all'espressione di AIRE (Anderson G.et al.; Nature Reviews 2007).

Un'altra funzione della proteina potrebbe essere quella di presentazione e processamento dell'antigene.(Uchida D. et al 2004).

Partners di AIRE

Varie osservazioni dimostrano che AIRE è un regolatore della trascrizione (Mathis and Benoist, 2009): è localizzata nel nucleo a livello dei nuclear bodies, contiene dei domini strutturali tipici di proteine che regolano la trascrizione, è associato con altri modulatori della trascrizione e può modulare l'espressione di numerosi geni.

In condizioni normali AIRE si localizza nei nuclear bodies dove è probabile che interagisca con altre proteine.

Attraverso esperimenti (Ferguson BJ, et al., 2008) di "gel filtration" di colture cellulari è stato dimostrato che AIRE fa parte di un grande complesso multiproteico di 65kDa.

Attualmente, sono note varie proteine che sono partner di AIRE, che partecipano in vari modi alla sua attività di modulatore della trascrizione:

1. CBP (CREB –binding protein). E' un fattore trascrizionale ubiquitario ed è il primo partner di AIRE identificato. CBP regola la trascrizione attraverso l'acetilazione e deacetilazione degli istoni. L'interazione AIRE-CBP che avviene nei nuclear bodies aumenta l'espressione dei suoi geni target

(Akiyoshi, H., et al.,2004), (Pitkänen, J. et al. 2005), (Ferguson BJ, et al., 2008). La formazione del complesso CBP-AIRE promuove la migrazione di CBP dal citoplasma al nucleo, come è dimostrato da colture di cellule di timo mancanti di AIRE, dove CBP rimane localizzato a livello citoplasmatico.

AIRE potrebbe facilitare l'importazione di CBP nel nucleo e aumentare la sua ritenzione nelle mTEC.

2. P-TEFb. E' elemento chiave nell'allungamento trascrizionale, infatti permette alla Polimerasi II di rilasciare il complesso d'inizio legato alla regione promotrice. L'interazione con AIRE ha evidenziato, in esperimenti di pull-down, un aumento della quantità di Polimerasi II nelle regioni intrageniche dove è presente il promoter dei geni target e di conseguenza anche un aumento del reclutamento del fattore P-TEFb. (Oven I. et al., 2007).
3. DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) (Liiv I, et al. 2008). La sua funzione è ancora controversa, si suppone che partecipi alla risoluzione dei "double-stranded breaks" nel DNA nucleosomico generati dalle topo isomerasi (Topo II). E' in grado di fosforilare un gran numero di proteine implicate nel processo di trascrizione, in particolare l'RNA polimerasi II. In vitro è in grado di fosforilare la proteina AIRE in due diverse posizioni della porzione amminotermine (Pontynen N, et al. 2008) aumentandone il potere trascrizionale.

4. Importina α . E' una proteina, che insieme all'importina β fa parte del complesso delle importine. Questo complesso trasporta proteine che posseggono l'NLS nel nucleo attraverso il riconoscimento dei pori nucleari. L'importina α si lega al NLS della proteina AIRE, e regola il suo trasporto nucleare (Ilmarinen T. 2007).
5. PIAS1. E' uno degli enzimi E3 della sumoilazione. La sua interazione con AIRE suggerisce il coinvolgimento di AIRE nel processo di sumoilazione. Tuttavia recenti esperimenti hanno dimostrato che AIRE non è sumoilata da Sumo 1, quindi l'esatto significato di questa interazione è ancora sconosciuto (Ilmarinen T. 2008).

Il preciso meccanismo con cui AIRE promuove l'espressione genica ectopica non è ancora del tutto chiaro ma vari studi hanno dimostrato che utilizza un meccanismo generico che non dipende da particolari caratteristiche o meccanismi di trascrizione operanti nelle mTEC. Aire possiede un meccanismo d'azione generale che può essere trasportato in tessuti diversi dalle mTEC, è il contesto cellulare che decide quali geni sono più suscettibili alla promozione trascrizionale da parte di AIRE.

Aire non si comporterebbe quindi come un fattore trascrizionale convenzionale che riconosce particolari sequenze di DNA su elementi enhancer e promotori, ma utilizzerebbe meccanismi di modificazione della cromatina.

AIRE, attraverso il suo PHD 1 è in grado di legare la lisina K4 non metilata dell'istone H3 (H3K4me0), modificazione associate con la cromatina inattiva.

Quindi, la propensione di AIRE a legare H3K4me0 indica che essa usa questo sistema epigenetico per regolare la trascrizione dei suoi geni target.

Nei promotori dei geni target, AIRE è in grado di incrementare H3K4me3 e AcH3, ovvero le modificazioni istoniche associate con la cromatina attiva.

Quando la cromatina è in uno stato attivo, AIRE e altri fattori trascrizionali possono attivare l'espressione dei loro geni target.

L'attivazione dei geni avviene in maniera casuale e con differenti pattern di espressione nelle varie mTEC, che dipende dal rapporto stechiometrico con i vari fattori trascrizionali di ciascuna cellula (Fig.11).

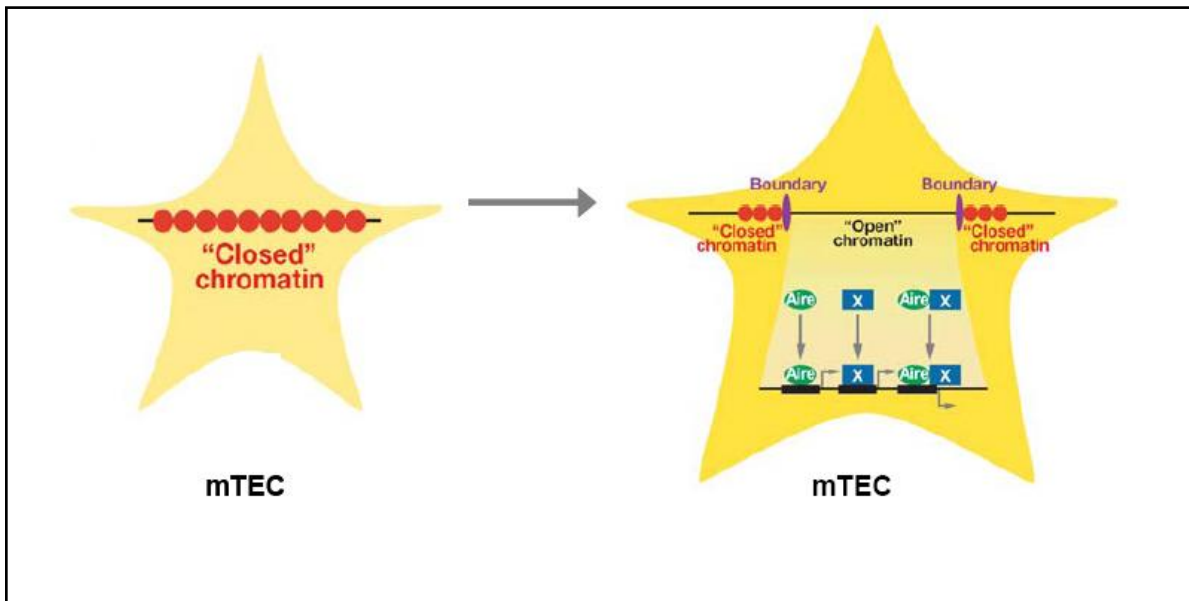


Fig.11: Meccanismo epigenetico proposto per AIRE nelle mTEC. (Modificato da Sinemous A.2010).

Oltre all'approccio epigenetico sono state formulate altre ipotesi sul meccanismo che regola l'attività trascrizionale di AIRE.

Uno di questi meccanismi è quello dell'allungamento della trascrizione, attraverso l'interazione con pTEFb nella matrice nucleare, ed il legame con CBP e DNA-PK.

Recentemente è stato eseguito uno studio, attraverso un approccio proteomico su larga scala per identificare un array di potenziali partners di AIRE (Abramson J. et al.,

2010). Le proteine identificate sono state suddivise in quattro categorie: proteine di trasporto nucleare, proteine che legano la cromatina, proteine coinvolte rispettivamente nella trascrizione e nel processamento dell'RNA (Fig.11).

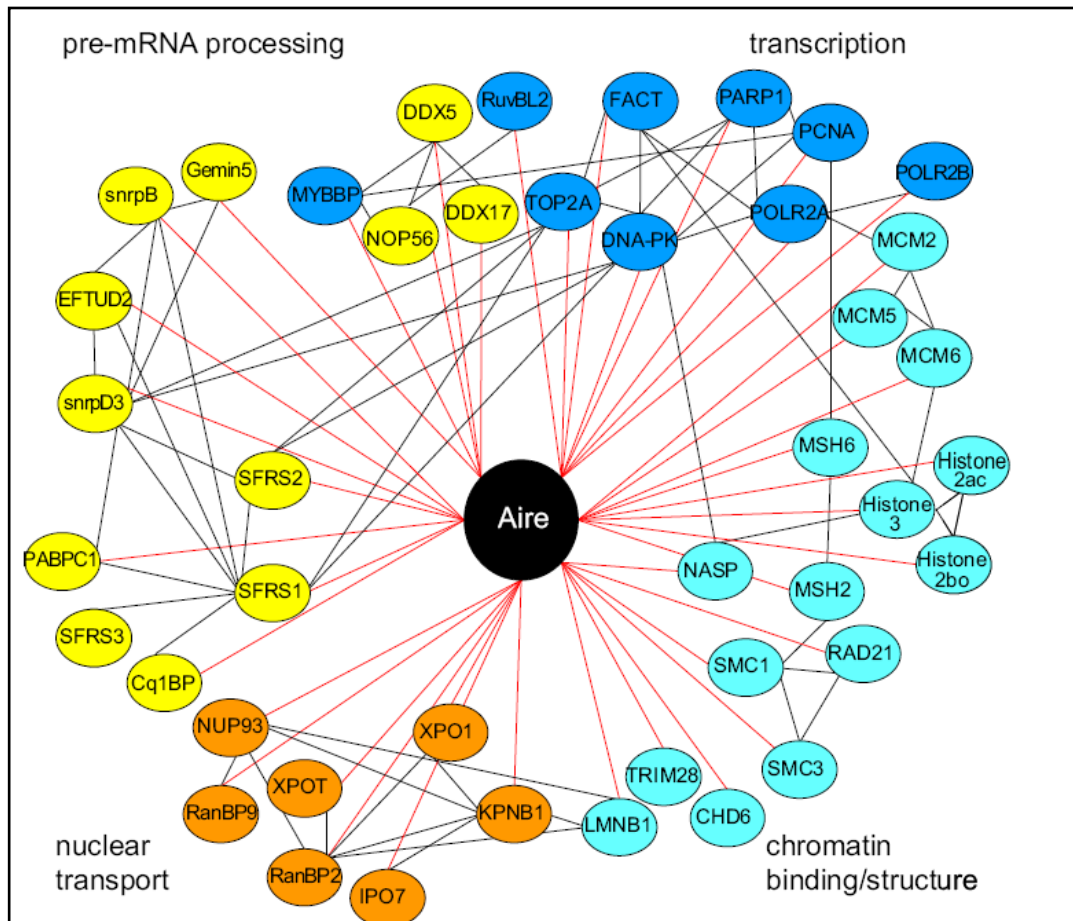


Fig 11: Rete molecolare dei vari partner di AIRE (Abramson J. et al., Cell 2010).

Questo studio ha dimostrato che AIRE può partecipare a numerosi pathway cellulari.

La scoperta di questi nuovi partners ha portato gli autori a disegnare un modello d'azione per la proteina AIRE, come mostrato nella figura 12.

AIRE entra nel nucleo attraverso il complesso delle importine e si localizza preferenzialmente in regioni della cromatina inattiva dal punto di vista trascrizionale, attraverso il suo legame con la lisina K4 dell'istone H3. All'interno di questa regione interagisce con una topoisomerasi, TOP 2a promuovendo la risoluzione dei "double-stranded breaks" e favorendo così il legame di DNA-PK ad altri complessi di rimodellamento cromatinico.

AIRE legato ai suoi partners (inclusi DNA-PK e TOP2) può partecipare a quello che viene chiamato "eviction complex" che dissocia il dimero istonico H2AX e H2B posto davanti all'RNA polimerasi II che procede lungo il nucleosoma impacchettato, nello stesso tempo, dopo il passaggio della polimerasi, AIRE riassembla l'ottamero istonico. In questo modo la proteina AIRE aumenterebbe l'efficienza della trascrizione.

Un'altra ipotesi è che AIRE, facente parte di un altro complesso proteico potrebbe promuovere l'accumulo di mRNA maturo attraverso la riattivazione della RNA polimerasi II, "in fase di stallo" in posizione 5', stabilizzando corte molecole di pre-mRNA attraverso splicing appropriati (Abramson J. et al., 2010).

Considerando le recenti scoperte e le conoscenze che si stanno accumulando sulla proteina AIRE appare chiara l'importanza sia di studi funzionali indirizzati ai domini responsabili della sua attività che di studi di interazione tra la proteina AIRE ed altri eventuali partner proteici.

E' chiaro dunque che l'identificazione dei vari partner di AIRE, associati direttamente o indirettamente ad AIRE possono chiarire i meccanismi con cui essa esplica la funzione di regolatore della trascrizione *AIRE* (Abramson J. et al., 2010).

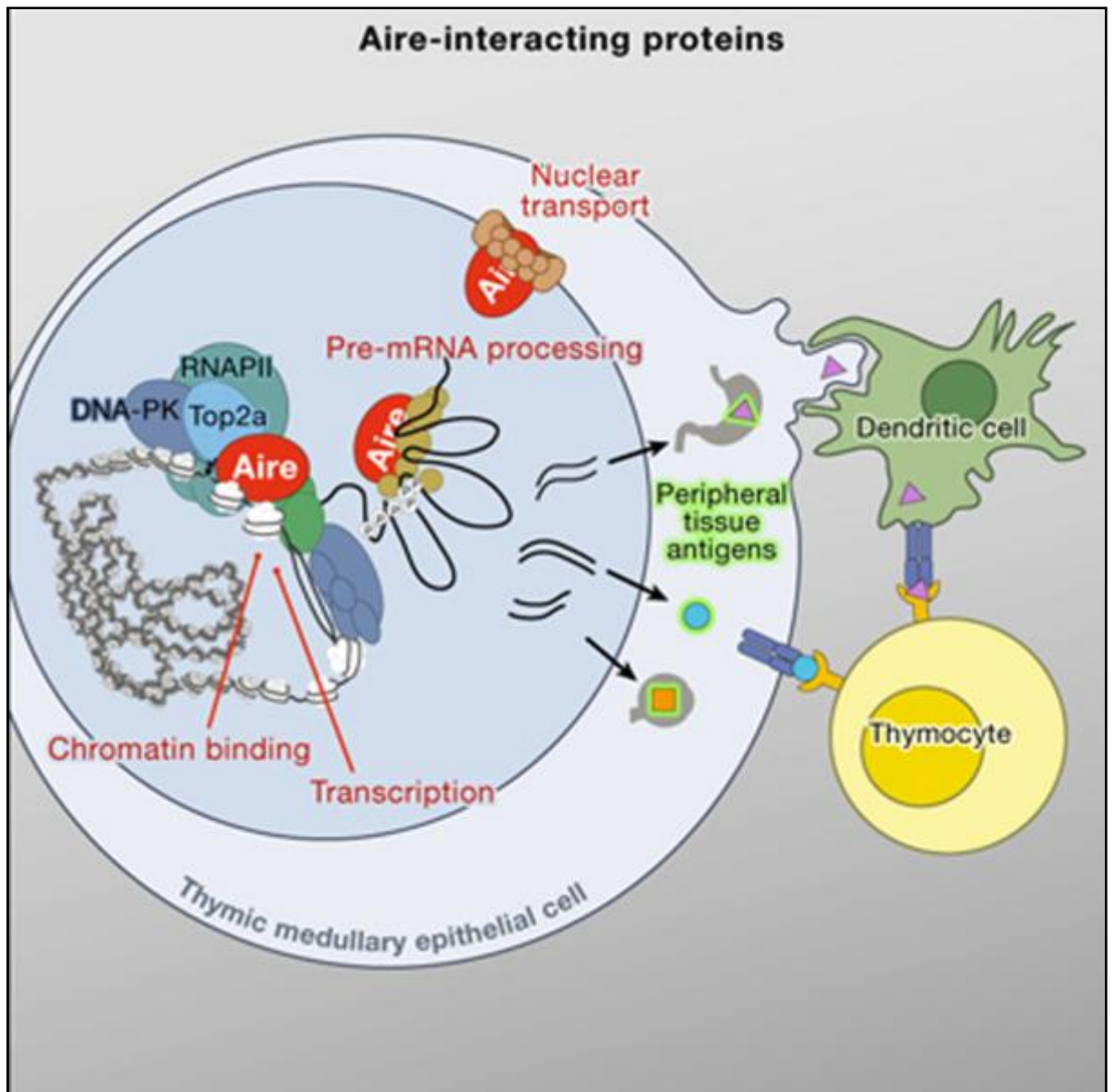


Fig.12: Modello molecolare proposto per la regolazione trascrizionale di AIRE (Abramson J. et al., Cell 2010).

OBIETTIVO DELLO STUDIO

Data la sua natura monogenica l'APECED rappresenta un modello "affascinante" di malattia autoimmune. Da quando AIRE è stato identificato come gene difettivo nella patologia APECED, numerosi studi in vivo e vitro hanno dimostrato che la sua funzione è quella di regolatore della trascrizione. Nel corso degli anni, si è giunti alla conclusione che esso sia in grado di regolare l'attività di centinaia se non migliaia di geni. Ma allo stesso tempo, esso può essere "up o down regolato" da altri geni target. A tutt'oggi i meccanismi molecolari della sua regolazione sono in parte sconosciuti.

Nella prima parte dello studio il nostro obiettivo è stato quello di caratterizzare alcuni dei possibili partner proteici che interagiscono con la proteina AIRE e che costituiscono il complesso multiproteico con cui essa esplica il suo ruolo biologico. La ricerca delle proteine di interazione potrebbe contribuire a chiarire quali siano i meccanismi che regolano la sua attività come regolatore della trascrizione e quali processi biochimici siano coinvolti nella sua regolazione. Il nostro studio è stato eseguito mediante la tecnica dei due ibridi in cui una libreria di

cDNA di timo umano è stata coespressa insieme al cDNA della proteina AIRE in cellule di lievito.

La nostra ricerca è proseguita con esperimenti specifici atti a confermare la validità dell'interazione tra la proteina AIRE ed un partner proteico isolato e a stabilirne il significato funzionale.

MATERIALI E METODI

Tecnica dei Due Ibridi per la ricerca di proteine di interazione con la proteina AIRE

Principio del metodo

In questo sistema il gene AIRE è stato espresso come proteina di fusione con un dominio GAL 4 DNA-binding domain (DNA-BD) mentre i cDNA estratti da una libreria di timo umano sono stati fusi con un dominio GAL4 di attivazione (AD). Quando la proteina AIRE e le proteine della libreria interagiscono, i domini DNA-BD e AD si trovano fisicamente vicini attivando la trascrizione dei geni reporter. Per poter essere utilizzata in questo sistema la proteina AIRE è stata modificata eliminando la porzione COOH-terminale responsabile del fenomeno dell'autoattivazione. La proteina modificata è stata co-trasformata insieme alle proteine di timo all'interno di cellule di lievito AH109. La prima co-trasformazione è avvenuta in condizioni di bassa stringenza, cioè in lieviti che venivano fatti crescere in assenza di Leucina e Triptofano, poiché i marker di selezione nutrizionale per questi aminoacidi sono posseduti dai due costrutti contenenti rispettivamente il DNA-BD e AD. E' stato

avviato lo screening dei cloni raccolti che sono stati fatti crescere in condizioni di alta stringenza in un terreno selettivo mancante di Leucina, Triptofano, Adenina e Istidina. I geni che producono questi ultimi due elementi nutrizionali dei lieviti sono due geni reporter, che verranno attivati solo in caso di specifica interazione tra la proteina AIRE ed una proteina codificata dalla libreria di timo. Il terzo gene reporter è rappresentato dal gene Mel1 che attivato produce l'enzima α -galattosidasi che idrolizza il suo substrato cromogeno α -D-galattopiranoside con formazione di un precipitato blu che conferisce la colorazione azzurra ai cloni positivi. Solo i cloni positivi saranno in grado di crescere in un terreno selettivo. I DNA plasmidici estratti dai cloni risultati positivi all'interazione con la proteina AIRE, sono stati amplificati mediante PCR e sottoposti a digestione enzimatica con l'enzima di restrizione Hae III allo scopo di stabilire il pattern di restrizione di ciascun clone. Un clone rappresentativo di ciascun pattern di restrizione è stato sottoposto a sequenziamento diretto. La sequenza ottenuta è stata analizzata utilizzando il programma BLAST, per la ricerca di omologie di sequenza.

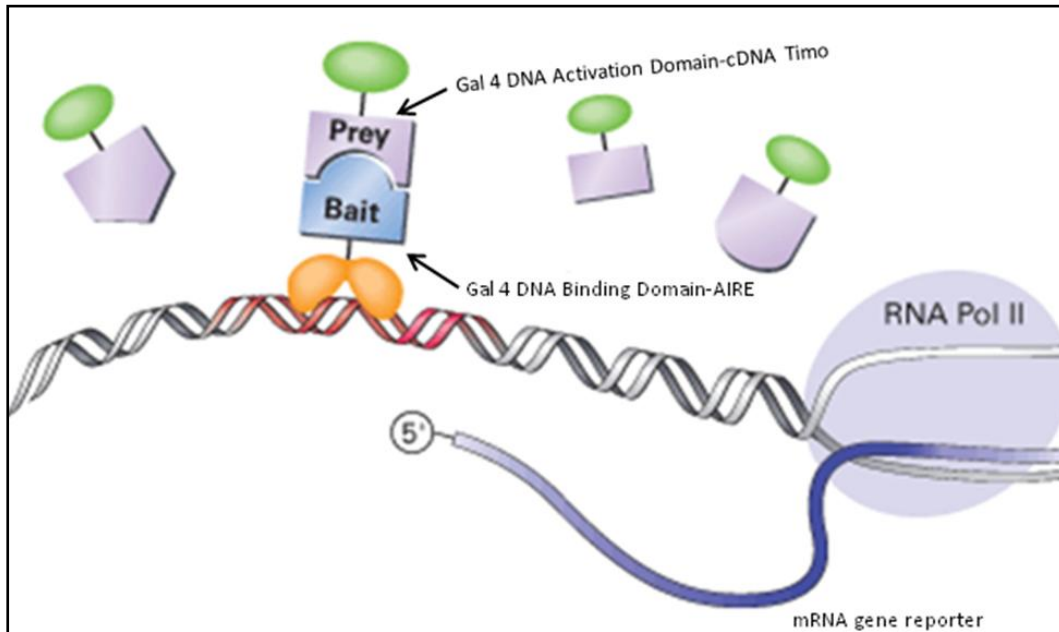


Fig.13: Rappresentazione schematica della tecnica dei due ibridi.

Metodi utilizzati per attuare la tecnica dei due ibridi

Per effettuare la tecnica dei due ibridi sono state attuate le seguenti fasi:

- *Clonazione del cDNA di AIRE all'interno del vettore pGBKT₇*
- *Titolazione della libreria plasmidica;*
- *Amplificazione della libreria plasmidica;*
- *Cotrasformazione in cellule di lievito dei costrutti pGBKT₇-AIRE (1-524) e pACT₂—in Libreria Timo;*
- *Estrazione e caratterizzazione del DNA plasmidico dei cloni risultati positivi allo screening della libreria;*

Clonazione del cDNA di AIRE all'interno del vettore pGBKT7

Digestione del vettore Bluescript-AIRE

Per clonare il cDNA di AIRE all'interno del vettore pGBKT7 abbiamo digerito il vettore Bluescript-AIRE con gli enzimi di restrizione NotI ed NcoI; le condizioni di reazione sono le seguenti:

Bluescript-AIRE	1µg
NotI	10 U
NcoI	10 U
Buffer NEB-3 10x	1x
Buffer NEB-4 10x	1x
Volume Finale	50 µl

La digestione enzimatica è stata incubata 1 ora a 37°C.

Successivamente la digestione enzimatica è stata seminata in gel di agaroso Low Melting e la banda corrispondente al frammento del cDNA del gene AIRE è stata escissa dal gel e conservata a 4°C.

Digestione del vettore pGBKT₇

Il vettore pGBKT₇ che comprende il DNA Binding Domain è stato digerito con gli enzimi di restrizione *NotI* e *NcoI* che ci consentiranno di clonare al suo interno il cDNA di AIRE.

Le condizioni di reazione sono uguali a quelle riportate in tabella 2

Alla reazione sono stati addizionati 0,4 Unità di CIP (Calf Intestinal Phosphatase) per evitare la ricircularizzazione del vettore digerito.

Successivamente la reazione è stata incubata a 65°C per disattivare l'enzima CIP.

Il vettore pGBKT₇ è stato purificato con Fenolo-Cloroformio e risospeso in 20 µl di H₂O ed eseguita la reazione di ligasi:

Vettore pGBKT7 linearizzato	1µl
Enzima T4 Ligase	1 U
Buffer T4 10x	1x
cDNA AIRE Low Melting	7µl
Volume Finale	20µl

La reazione è stata preincubata a 37°C per alcuni minuti, successivamente è stato addizionato il frammento di cDNA contenuto nell'agaroso Low Melting che è stato precedentemente sciolto mediante incubazione a 65°C.

La reazione di ligasi è stata incubata over night a 16°C, congelata a -80°C per 10 minuti e centrifugata a 12000 giri per 2 minuti a temperatura ambiente allo scopo di separare la fase liquida dal gel di agaroso.

Successivamente sono stati prelevati 2µl di reazione di ligasi ed utilizzati per la trasformazione di 100 µl di cellule competenti DH5α. 100 µl della reazione di trasformazione sono stati piastrati in terreno di coltura LB contenente l'antibiotico kanamicina in concentrazione di 50 µg/ml ed incubati a 37°C over night. Alcune delle colonie cresciute sono state prelevate ed inoculate in 3 ml di terreno LB liquido over night. Il terreno di coltura è stato addizionato dell'antibiotico kanamicina. Il DNA di tali colture è stato estratto con il metodo della "Mini Preparazione". Per verificare se il vettore pGBKT7 avesse integrato il cDNA di AIRE, il DNA estratto è stato digerito con gli enzimi di restrizione NotI e NcoI.

Titolazione della libreria plasmidica

La libreria plasmidica di timo umano, fornita con il kit MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3, è contenuta nel vettore pACT2. La libreria necessita di essere

titolata ed amplificata prima di essere utilizzata nello screening dei due ibridi. La libreria di timo umano è titolata mediante i seguenti passaggi:

Scongelare un aliquota della libreria e tenerla in ghiaccio;

- Agitarla lievemente. Trasferire 1µl di libreria in 1ml di terreno di crescita LB (Diluizione A);
- Rimuovere 1 µl della diluizione A e addizionala ad 1 ml di terreno di crescita LB, agitare lievemente;
- Addizionare 1µl di diluizione A in 50µl di terreno di crescita LB e piastrate in LB/amp;
- Piastrare aliquote da 50µl e da 100µl della diluizione B in LB/amp.;
- Lasciare le piastre 15/20 min a temperatura ambiente;
- Invertire le piastre ed incubarle a 37°C per 18-20 ore;
- per la libreria in pACT2 incubare a 30-31 °C per 36-48 ore;
- contare il numero delle colonie e calcolare il titolo della libreria secondo i seguenti calcoli:

Diluizione A: n. di colonie x 103 x 103 = cfu/ml

Diluizione B: n. di colonie/volume piastrato x103x103x103= cfu/ml

Il titolo della libreria è risultato pari a 2,4 x 10⁹ cfu/ml.

Amplificazione della libreria plasmidica

La quantità di libreria plasmidica di timo umano per screenare 1×10^6 cloni indipendenti corrisponde a 100-500 μg ; pertanto è necessario amplificare la libreria di timo precedentemente titolata.

- Piastrare la libreria direttamente in LB/amp con la quantità necessaria per ottenere una crescita cellulare vicina alla confluenza (20.000-40.000 cfu per piastre da 150 mm).
- Invertire le piastre ed incubarle a 30-31 °C per 36-48 ore
- Aggiungere circa 5 ml di LB/glicerolo per ogni piastra e raccogliere le colonie nel liquido. Versare tutte le colonie raccolte in una Falcon e agitare fortemente
- Separare e conservare opportunamente 1/3 della coltura per la successiva preparazione del DNA plasmidico; tale porzione può essere conservata a 4°C per un utilizzo entro le due settimane successive. Per una conservazione maggiore di 2 settimane, aliquotare in porzioni da 50 ml e conservare a -70 °C
- Preparare il DNA plasmidico utilizzando la GIGA Preparazione che permette di ottenere un prodotto altamente purificato.
- La quantità di DNA plasmidico atteso per 1×10^6 cfu corrisponde a 0.25 mg.

Per amplificare la libreria di timo sono state necessarie 525 piastre LB/amp.

Cotrasformazione in cellule di lievito dei costrutti pGBKT7-AIRE (1-524) e pACT2-

Libreria Timo.

Le condizioni della cotrasformazione sono le seguenti:

pACT2-Libreria Timo	1.5 mg
pGBKT7-AIRE (1-524)	1.0 mg
sperma di aringa	20 mg
AH109 competenti	8.0 ml
PEG/LiAc	60 ml

Miscelare i componenti della reazione in una beuta da 500 ml ed incubare 30 minuti a 30°C in agitazione

- Aggiungere 7.0 ml di DMSO;
- Heat shock per 15 minuti a 42°C;
- Incubare in ghiaccio per 1-2 minuti;
- Centrifugare brevemente alla massima velocità e rimuovere il surnatante;
- Risospendere le cellule in 500 µl di TE1X;
- Piastrare le cellule in terreno selettivo -Leu/-Trp/-Ade/-His X-α-Gal.

Estrazione e caratterizzazione del DNA plasmidico

Le colonie cresciute in alta stringenza (terreno con i marker nutrizionali Leu, Trp, Ade e His) sono state sottoposte all'estrazione del DNA plasmidico secondo il seguente protocollo:

- Prelevare una colonia di 2/3 mm di diametro;
- Risospendere le cellule prelevate in 200 µl di Lysis Buffer;
- Aggiungere un uguale quantità di biglie di vetro per favorire la lisi cellulare;
- -Aggiungere 200 µl di una soluzione di fenolo-cloroformio-isoamilalcol in proporzioni rispettivamente 25:24:1;
- Agitare fortemente al vortex per 5 minuti;
- Centrifugare 20 minuti a 12000 rpm e trasferire il surnatante in un nuovo tubo;
- Aggiungere 200 µl di cloroformio;
- Agitare fortemente al vortex;
- Centrifugare 15 minuti a 12000 rpm e trasferire il surnatante in un nuovo tubo;
- Aggiungere 500 µl di alcool puro e incubare 60' a -80°C;
- Centrifugare 10 minuti a 12000 rpm, eliminare il surnatante ed asciugare il pellet per 10 minuti a Temperatura ambiente;
- Risospendere in 80 µl di TE1X.

Il DNA estratto è stato utilizzato per trasformare cellule batteriche competenti DH5 α che sono state piastrate successivamente in terreno di crescita LB amp come precedentemente descritto.

Le colonie cresciute sono state sottoposte alla PEG precipitazione ed il DNA plasmidico estratto è stato digerito con l'enzima di restrizione BglII per liberare l'inserto contenuto nel plasmide.

Le condizioni di reazione sono le seguenti:

DNA PEG precipitato	1 μl
Buffer 10x	1x conc fin
BglII	10 Unità
Volume Finale	20μl

La digestione enzimatica è stata incubata 3 ore a 37°C.

Per caratterizzare il cDNA dei cloni positivi è stata utilizzata la tecnica della PCR mediante i primer 5'AD e 3'AD che fiancheggiano la regione che comprende l'inserto da caratterizzare.

Le condizioni di amplificazione sono le seguenti:

DNA PEG precipitato	1 μl
DMSO	10%
Buffer 10x	1x conc finale
primer 5'AD	10 pm
primer 3'AD	10 pm
dNTP	0.2 mM
Volume Finale	50μl

File di amplificazione: 30'' a 94°C, 30 ''a 63°C e 1'30'' a 72°C per 35 cicli.

I prodotti di PCR sono stati digeriti con l'enzima di restrizione *HaeIII*.

Le condizioni di reazione sono le seguenti:

DNA amplificato	15μl
HaeIII	10 U
Buffer 10x	1x
Volume Finale	20 μl

La digestione enzimatica è stata incubata 3 ore a 37°C.

STUDI DI INTERAZIONE AIRE-DAXX

Lo screening dei due ibridi ci ha permesso di caratterizzare diversi cloni. Sette di questi cloni positivi codificano per la regione C-terminale della proteina DAXX (aa 629-740) corrispondente alla “Ser/Pro/Thr rich-region”.

Al fine di mappare i domini di interazione delle due proteine interagenti e per capire il significato funzionale di questa interazione abbiamo eseguito dei saggi aggiuntivi:

- ✓ *Saggio supplementare dei due ibridi in cellule di lievito (per mappare i domini di interazione).*
- ✓ *Test di interazione in vivo in cellule di mammifero (per confermare l'interazione e mappare i domini di interazione).*
- ✓ *Test di transattivazione (per definire il significato funzionale dell'interazione).*
- ✓ *Test di interazione in vitro in cellule di batteri (per confermare ulteriormente l'interazione).*

Saggio supplementare dei due ibridi in cellule di lievito

Per mappare i siti di interazione della proteina AIRE con la proteina DAXX abbiamo utilizzato la tecnica dei due ibridi in un sistema di cellule di lievito.

I costrutti di AIRE deleti (aa1-413; 1-161; 1-100; 12-517; 68-517) ottenuti mediante PCR, sono stati sub clonati nel vettore pGBKT7 DNA-BD mentre i costrutti pGBKT7-(1-517) e pGBKT7-W78R sono stati ottenuti inserendo dei cambi aminoacidici mediante mutagenesi sito-specifica sul costrutto pGBKT7-AIRE full-length.

Il cDNA di DAXX ottenuto mediante PCR è stato clonato all'interno del vettore di espressione per lieviti pGADT7, che contiene il GAL4 Activation Domain (GAL4-AD). Tutti i costrutti sono stati co-trasformati con il costrutto DAXX Wild Type (aa 1-740). Inoltre per verificare se la regione S/P/T (aa 629-740) è l'unico dominio di interazione di DAXX abbiamo prodotto un costrutto pGAD-DAXX con un codone di stop in posizione 629, attraverso mutagenesi sito-specifica.

Quando le due proteine o i relativi mutanti interagiscono, i domini DNA-BD e AD si trovano fisicamente vicini e attivano la trascrizione dei geni reporter. La crescita di colonie blu indica l'attivazione dei geni reporter in seguito all'interazione tra le proteine co-esprese nelle cellule di lievito.

MUTAGENESI SITO SPECIFICA

Principio del metodo

Con la tecnica della mutagenesi sito-specifica è possibile inserire in una data sequenza del DNA a doppia elica, una mutazione puntiforme, la delezione o l'inserzione di uno o più nucleotidi. Per ciascuna variante verranno costruiti due oligonucleotidi sintetici (primer), ciascuno complementare ai due "strand" del vettore plasmidico, che dovranno essere lunghi circa 30-45 basi in modo da permettere l'ibridazione sul DNA anche in assenza di perfetta complementarietà. La mutazione desiderata dovrà trovarsi nella parte centrale con 10-15 basi della sequenza corretta da entrambe le parti, la T_m dovrà essere almeno 10° superiore alla temperatura di estensione e il contenuto di G e C dovrà essere superiore al 40%. Queste caratteristiche dei primer sono di fondamentale importanza per ottenere una elevata efficienza di mutagenesi. A partire dalle estremità dei primer la specifica polimerasi terminerà poi di sintetizzare il filamento (circolare) complementare. Al termine del primo ciclo di PCR quindi si avranno plasmidi che avranno un filamento con la mutazione (quello contenente il primer con mutazione) e il filamento originario, con sequenza wild tipe. Dopo 25 cicli il rapporto tra filamenti con mutazione e filamenti senza è di 8 milioni a 1, quindi quasi l'intera soluzione è costituita da plasmidi amplificati mutati. Nonostante il plasmide usato come stampo (privo di mutazione) è uno solo contro moltissimi mutati, esso viene comunque

eliminato per digestione enzimatica con l'enzima di restrizione Dpn1, che riconosce le sequenze di DNA metilato. L'enzima degraderà solo il plasmide copia in quanto questo originariamente metilato, mentre preserverà quello mutato che si è prodotto in vitro (e quindi in assenza di DNA metilasi).

Piano sperimentale

Le forme mutanti dei costrutti pGBKT7-AIRE sono state ottenute mediante mutagenesi sito specifica utilizzando il Kit QuickChange site-directed Mutagenesis (Stratagene) secondo il seguente schema:

In un tubo da 0,2ml vengono assemblati i seguenti componenti:

DNA plasmidico	50ng
Buffer 10x	5µl
Primer Forward	130 ng
Primer Reverse	130ng
dNTP Stock Solution 10mM	1µl
H2O	fino a 50 µl
Pfu DNA Polimerasi	1 µl

Il File di amplificazione utilizzato per la mutagenesi è il seguente:

5' 5°C - 1 '95°C - 2 '42°C - 20 '68°C. Per 20Cicli.

Alla PCR vengono aggiunte 10 Unità di Enzima di restrizione Dpn1 e incubato per 1 ora a 37°C. Un'aliquota della PCR trattata con Dpn1 viene trasformata in cellule batteriche competenti DH5α secondo il seguente schema:

- 100 µl di cellule competenti XL1 Blue scongelate in ghiaccio;
- 5 µl PCR Mutagenesi;
- Incubare 30 minuti in ghiaccio;
- Shock termico 42°C per 90 secondi;
- Aggiungere 900 µl di Medium SOC;
- Incubare a 37 ° in agitazione per 1 ora;
- Piastrare 100 µl in terreno solido nutritivo LB + Ampicillina 100 µg/ml;
- Incubare la piastra over night a 37 °C.

Venti cloni sono stati prelevati dalla piastra e fatti crescere in 3 ml di terreno nutritivo liquido LB + Ampicillina 100 µg/ml a 37°C in agitazione over night.

Il DNA plasmidico è stato estratto dalle colonie secondo il metodo della "Minipreparazione".

Il DNA estratto dai cloni è stato sottoposto a sequenziamento diretto mediante il sequenziatore automatico ABI 3130 e il metodo dei Big Dye Terminator. I cloni che portavano la correzione desiderata sono stati isolati e utilizzati per le applicazioni successive.

Analisi quantitativa dell'α-Galattosidasi.

Per analizzare quantitativamente l'interazione tra le due proteine abbiamo valutato la produzione dell'enzima α-galattosidasi utilizzando come substrati α-D-galattopiranoside e *p*-nitrophenil che idrolizza il suo substrato cromogeno α-D-galattopiranoside con formazione di un precipitato blu che conferisce la colorazione azzurra ai cloni positivi.

Ogni esperimento è stato ripetuto quattro volte secondo le istruzioni del manuale (CLONTECH Machmaker).

Per valutare quantitativamente l'interazione fisica tra le due proteine abbiamo misurato la produzione dell'enzima α-Galattosidasi; la metodica prevede i seguenti passaggi:

1. Inoculare 2-5 ml di terreno sintetico liquido contenente i supplementi appropriati, con una colonia di lievito che esprime le proteine da analizzare.
2. Vortexare il tubo contenente la colonia per 30" per disperdere le cellule. Trasferire 1 ml di sospensione cellulare in una cuvetta e registrare l'OD600 che dovrebbe risultare intorno al valore di 0.5-1.0.
3. Mettere 1 ml di coltura in un tubo da microcentrifuga da 1.5 ml e centrifugare a 14000 rpm per 2'.
4. Con attenzione trasferire il surnatante e conservarlo a temperatura ambiente per il successivo uso.

Test colorimetrico

- Preparare una quantità sufficiente di Assay Buffer per tutti i campioni compresi i controlli. Per ciascun test di 1 ml sono necessari 24 µl di Assay Buffer.
- Trasferire il terreno di coltura del passaggio 4 in un tubo da microcentrifuga da 1.5 ml.
- Aggiungere 48 µl di Assay Buffer ad ogni campione da analizzare.
- Incubare 60' a 30 C.
- Terminare la reazione aggiungendo 960 µl di Stop Buffer 1X.
- Registrare la densità ottica di ogni campione a 410 nm (OD410).
- Calcolare le unità di α-Galattosidasi.

Una unità di enzima è definita come la quantità di enzima che idrolizza 1 µmole di p-nitrofenil-α-D-galattoside a p-nitrofenolo e D-galattoso nel tempo di 1 ora alla temperatura di 30 C, in una soluzione di acetato a pH 4.5.

Le unità di α-galattosidasi sono calcolate con la seguente formula:

$$\text{Milliunità}/(\text{ml} \times \text{cellule}) = \text{OD400} \times V_f \times 1,000 / [(\epsilon \times b) \times t \times V_i \times \text{OD600}]$$

t = tempo di incubazione

Vf =volume finale

V_i = volume del terreno di coltura addizionato

$\epsilon \times b$ assorbanza molare del p-nitrofenolo a 410 nm per cammino della luce nel mezzo espresso in cm.

Test di interazione in vivo in cellule di mammifero

Colture cellulari e trasfezione transiente con lipofectamina 2000

Colture cellulari

Le cellule ad adherenza COS1 (African green, kidney Monkey) e Hela (Human Epithelial Cell) sono state fatte crescere in terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), supplementato con FCS (Siero Fetale Bovino) al 10%, 2mM glutammina e 5mM degli antibiotici Penicillina e Streptomicina. Le colture cellulari sono state mantenute in incubatore a 37°C con atmosfera controllata di CO² al 5%.

Trasfezione transiente con Lipofectamina 2000-Metodo della Lipofezione

Le lipofectamine sono una classe di molecole formate da una coda policationica a cui si lega il DNA e da una porzione lipidica che facilita il passaggio del complesso DNA-lipofectamina attraverso la membrana cellulare. Con questo metodo si ottimizza l'efficienza della trasfezione e si semplificano i passaggi sperimentali.

Il protocollo utilizzato è il seguente:

- Il giorno precedente la trasfezione le cellule vengono divise e piastrate per la giornata successiva. Un'elevata efficienza di trasfezione richiede che le cellule raggiungano l'80-90% della confluenza.
- Le cellule (circa 3×10^5 cell/ml) sono state piastrate in piastre sterili a 6 pozzetti di 35 mm di diametro, contenenti ciascuna 2 ml di DMEM (Invitrogen) senza antibiotici, 10% FBS e L-glutamina 2 mM. La conta delle cellule è stata eseguita utilizzando la camera di Burker mescolando 20 μ l di Trypan Blue 0.5% (BioInd) a 20 μ l di sospensione cellulare.
- Le cellule vengono mantenute in un incubatore termostato a 37°C, umidità relativa controllata e 5% CO₂ per circa 24 ore. Un'elevata efficienza di trasfezione richiede che le cellule raggiungano il 50-80% di confluenza.
- Il DNA dei plasmidi circa 2 μ g viene diluito in 86,6 μ l di terreno DMEM privo di antibiotici e siero e 3 μ l di lipofectamine.
- Incubare a temperatura ambiente per 30'.
- Distribuire la mix in ogni piastra contenente già il monostrato cellulare addizionato di medium DMEM.
- Incubare a 37°C in atmosfera controllata di CO₂ al 5%.
- Dopo 4 ore sostituire il terreno con DMEM fresco privo di antibiotico.
- Dopo 48 ore raccogliere le cellule.

Per confermare l'interazione AIRE-DAXX in vivo abbiamo eseguito in cellule di mammifero, sia la tecnica della co-immunoprecipitazione sia la tecnica dell'immunofluorescenza al microscopio confocale.

Saggio della co-immunoprecipitazione

Principio del metodo

La co-immunoprecipitazione è una metodica comunemente utilizzata per identificare le interazioni proteina-proteina. Questa procedura implica la lisi cellulare del tessuto o linea cellulare dove la proteina AIRE viene espressa, l'incubazione del lisato con gli anticorpi specifici contro la proteina AIRE ed infine la precipitazione del complesso anticorpo-proteina mediante l'aggiunta della Proteina G (estratta da Staphilococcus aureus) che ha grande affinità per la porzione Fc degli anticorpi. In tali condizioni native è possibile isolare la proteina AIRE e le eventuali proteine con la quali interagisce.

Non avendo a disposizione cellule di timo in cui la proteina AIRE è altamente espressa, abbiamo utilizzato cellule di mammifero che sono state trasfettate con il cDNA di AIRE e DAXX mediante la tecnica della lipofezione.

Plasmidi utilizzati nei saggi di co-immunoprecipitazione

Il cDNA di AIRE è stato amplificato e clonato nel plasmide pEF5HA (donato dal gruppo di Nunzio Bottini La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA) utilizzando i primer contenenti i siti di restrizione NotI e EcoRI, e nel plasmide pcDNA3.1-V5/C (Invitrogen) con i primer contenenti i siti di restrizione NotI.

Il pcDNA 3.1-Xpress DAXX è stato preparato mediante amplificazione e clonazione utilizzando primer contenenti i siti EcoRI-XbaI, mentre il pCMV-XL5-DAXX è stato fornito da OriGene (Rockville, MD).

Piano sperimentale

Quarantotto ore dopo la trasfezione le cellule sono state trattate con tripsina, lavate con PBS e raccolte per centrifugazione.

Le cellule (circa 10^6) trasfettate con i costrutti AIRE-HA descritti sopra e il plasmide pXL5-DAXX sono stati lisati in ghiaccio con 0,5 ml di Lysis Buffer (50mM di Tris-HCl a pH 7,5, 50 mM di NaCl, lo 0,2% di Nonidet P-40, 5 μ m di ZnCl₂, 30mM di Na₄P₂O₇, 50 mM di NaF e 2mM di Sodio Orto Vanadato, 1 mM di phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) e inibitori delle proteasi.

I lisati cellulari sono stati centrifugati a 12.000g per 12 minuti a 4°C e il supernatante (500-700 μ g di proteina estratta da ogni esperimento) è stata prechiarificata con 50 μ l di resina al 50% di proteina G sepharoso (Amersham) per 4 ore a 4°C. Dopo

centrifugazione sono stati aggiunti al supernatante 1 ug di anticorpo anti-HA lasciato incubare in agitazione overnight alla temperatura di 4°.

Per recuperare il complesso proteico sono stati aggiunti a ogni campione 50µl di resina al 50% di proteina G sepharoso 4B e successivamente sono stati incubati per 4 ore a 4°C. Dopo centrifugazione, le biglie di Protein G sepharoso che hanno legato le proteine, sono state raccolte, lavate con PBS contenente lo 0,2% di NP40, e bollite per 5 minuti con 30µl di Sample Buffer 2x (4% SDS; 20% Glicerolo; 0.004% Blu di bromofenolo; 0.125 M Tris HCl (pH 6.8); 10% beta-mercaptoetanol). Le proteine immunoprecipitate sono state sottoposte ad elettroforesi su gel di SDS al 10% di poliacrilamide. Il gel è stato trasferito su membrana di nitrocellulosa che è stata ibridata con anticorpo anti DAXX (Cell Signaling Technology), anti V5 (Invitrogen) e anti HA (Covance). La rivelazione è stata eseguita, previa incubazione con anticorpi secondari anti mouse e anti rabbit, con il sistema ECL Western Blot detection system (AmershamBioscience).

Test di omodimerizzazione

Per il test di omodimerizzazione le cellule COS-1 sono state trasfettate con una quantità costante di AIRE-HA e AIRE-V5 con una quantità crescente di DAXX-Xpress (0.6-1.2-2ug).

La proteina AIRE è stata immunoprecipitata dal lisato cellulare usando 1ug di anticorpo anti V5.

Test di trasattivazione

Saggio della luciferasi

Quarantotto ore dopo la trasfezione le cellule sono state trattate con tripsina, lavate con PBS e raccolte per centrifugazione. Le cellule sono state lisate con 200µl di Passive Lysis Buffer (PROMEGA) e l'attività luciferasica prodotta è stata valutata mediante Dual Luciferase Assay (PROMEGA).

Principio del metodo

*Il sistema da noi utilizzato prevede l'utilizzo del promotore dell'insulina umana. In letteratura è riportato che la proteina AIRE induce l'espressione del gene dell'insulina umana poiché ne riconosce il promotore. Il cDNA del promotore dell'insulina è stato clonato nel costrutto pG5Luc che contiene la sequenza del TATA box minimo che a sua volta si trova a monte del gene della luciferase Firefly (*Photinus pyralis*). Il costrutto pEFHA-AIRE leggerà la sequenza consenso del promotore dell'insulina situata su pG5Luc, in questo modo attiverà la trascrizione del gene reporter luciferasi Firefly. Firefly e Renilla luciferasi hanno un'origine evolutiva distinta e per questo possiedono una struttura enzimatica diversa e richiedono substrati differenti. Queste differenze permettono di discriminare le loro reazioni bioluminescenti. Con il sistema Dual Luciferase Assay la luminescenza*

prodotta dalla Firefly Luciferasi viene silenziata mentre simultaneamente viene attivata la reazione luminescente della Renilla Luciferasi.

La reazioni di bioluminescenza catalizzate da Firefly e Renilla sono le seguenti:

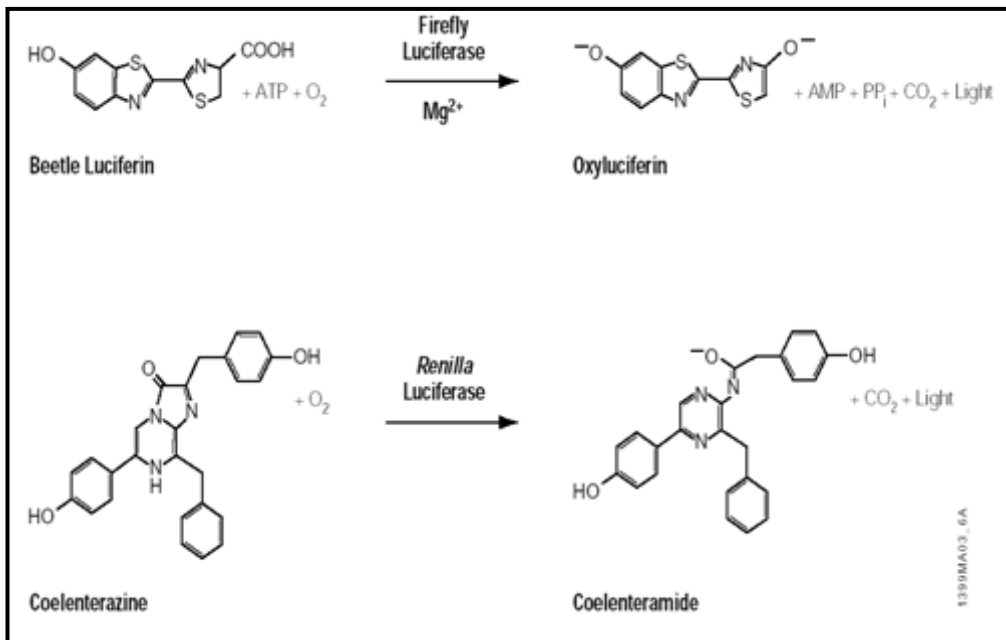


Fig.14: Plasmidi utilizzati nei saggi di luciferasi.

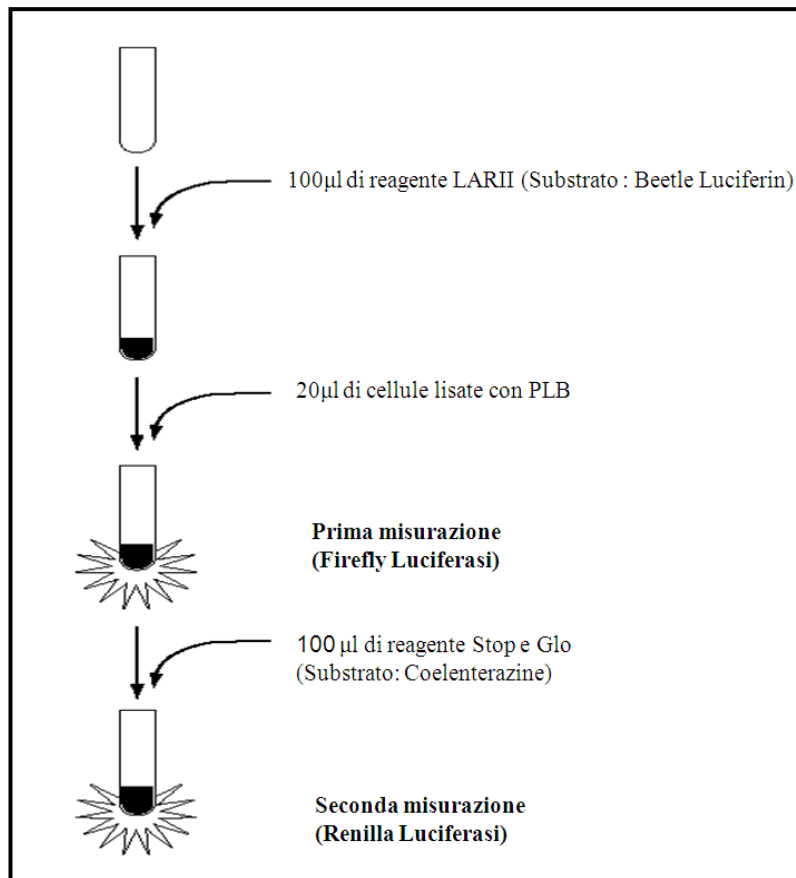
Il cDNA di AIRE è stato amplificato e clonato nel plasmide pEF5HA (donato dal gruppo di Nunzio Bottini La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA) utilizzando i primer contenenti i siti di restrizione NotI e EcoRI.

Il cDNA di DAXX umano è stato clonato nel plasmide pCMV-XL5 acquistato da OriGene (Rockville, MD). Il plasmide contenente il promotore fornito dal Dott. Paolo Moi, Università di Cagliari, Italia) del gene reporter dell'insulina (pMG3-insulin/Luc) contiene una singola copia del promotore dell'insulina, clonata a monte

del gene reporter della luciferasi. Il plasmide di controllo pGL4 guida l'espressione costitutiva della luciferasi Renilla fornita dalla Promega (Fig. 10).

Piano sperimentale

Il Dual Luciferase assay è stato eseguito utilizzando il luminometro Microlumat (Berthold) secondo il seguente schema :



Ogni esperimento è stato eseguito in quadruplicato. Il valore di luciferasi prodotta corrisponde alla capacità del costrutto pBIND-AIRE di attivare la trascrizione del gene reporter e permette di quantificare l'attività trans attivante della proteina AIRE e delle sue varianti di fusione. Il valore di luciferasi Firefly prodotta è espresso in % RLA (Attività Luciferasica Relativa) e viene calcolato secondo la seguente formula:

$$\frac{\text{LUC 1 / REN 1}}{\text{LUC 2 / REN 2}} \times 100$$

Per gli studi sull'inibizione della deacetilazione, 5 ore dopo la trasfezione è stata aggiunta la TSA (Trichostatin A; SIGMA) ad una concentrazione finale di 100ng/ml. Le cellule sono state successivamente incubate per 24 ore.

IMMUNOFLUORESCENZA

Le cellule HeLA 1.5×10^5 sono state seminate su un vetrino per colture cellulari e trasfettate con 320ng di AIRE-GFP e 320ng di pXL5-DAXX.

Dopo 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state fissate con metanolo per 5 minuti in ghiaccio e con etanolo a temperatura ambiente.

Le cellule sono state permeabilizzate con PBS contenente 1% di Triton X-100 per 10 minuti a temperatura ambiente e bloccati i siti aspecifici con 8% di albumina siero bovina in PBS per 45 minuti.

Di seguito è stato incubato l'anticorpo anti DAXX (Cell-Signaling) diluito 1:200 in PBS contenente il 3% di BSA, per 1 ora a 37°C. Per la rivelazione del complesso antigene-anticorpo è stato utilizzato l'anticorpo secondario anti rabbit Ig Texas Red, incubato per 20 minuti a 37°C.

Il nucleo è stato evidenziato con 4',6-diamidino-2 phenilindolo diluito 1:1000 in PBS incubato 5' a temperatura ambiente.

I vetrini, a cui è stato montato un vetrino copri-oggetto sono stati osservati con un microscopio a confocale LSM della Leica, utilizzando i set di filtri isotiocianato e TRITC.

Test di interazione in vitro in cellule batteriche

Saggio di GST-Pulldown

Principio del metodo

Il saggio di pulldown è un metodo in vitro per determinare l'interazione fisica tra due o più proteine: può essere utile per riconfermare un'interazione proteina-proteina precedentemente rilevata con un'altra metodica (quali coimmunoprecipitazione e saggio dei due ibridi) o per identificare nuove interazioni proteiche.

Il saggio di pulldown è una cromatografia di affinità in cui un'esca proteica coniugata ad un tag (quali GST, 6HIS, Flag) è "catturata" da un ligando immobilizzato in grado di legare specificamente il tag, generando un supporto di affinità secondario per isolare altre proteine "preda" in grado di interagire con l'esca.

Esca e preda possono essere ottenute da molteplici fonti, tra cui i lisati cellulari, proteine purificate, sistemi di espressione e sistemi di trascrizione/traduzione in vitro.

Le condizioni e i parametri di legame tra esca e preda da utilizzare dipendono dal tipo di interazione. Interazioni stabili sono più facili da rilevare e possono resistere ai lavaggi con tamponi ad alta forza ionica, che vengono effettuati per eliminare falsi positivi causati da interazioni non specifiche. Al contrario, interazioni deboli e transienti sono assai più difficili da rilevare in quanto possono dissociarsi durante il

saggio. Successivamente, l'identificazione dell'interazione esca-preda richiede che il complesso sia rimosso dal supporto di affinità e analizzato. L'intero complesso può essere eluito utilizzando il tampone di caricamento dell' SDS-PAGE o per mezzo di uno specifico analita competitivo per il tag o per la proteina esca.

Una volta eluito, il complesso può essere analizzato mediante SDS-PAGE e successivamente con metodi di visualizzazione quali Western Blot o autoradiografia.

Nell'autoradiografia vengono visualizzati isotopi radioattivi, che vengono incorporati ad esempio durante la traduzione in vitro della preda.

La tecnica utilizzata negli esperimenti descritti in questo lavoro è quella del GST-pulldown, che utilizza una proteina di fusione con la GST (esca) legata a biglie coniugate con glutatione (GSH) al fine di purificare per affinità delle proteine (prede) che interagiscono con tale esca.

Protocollo sperimentale

La tecnica utilizzata negli esperimenti descritti in questo lavoro è quella del GST-pulldown, che utilizza una proteina di fusione con la GST (esca) legata a particelle coniugate con glutatione (GSH) al fine di purificare per affinità delle proteine (prede) che interagiscono con tale esca.

Cellule di *Escheirichia coli* (BL21SI), sono state trasformate con pGEX2T-GST e PGEX-2T-AIRE (aa 1-160) in 2XYTA con 100ug di ampicillina e indotta l'espressione proteica con 0.1 mM di isopropil-thio-b-D-galattopiranosil per 3 ore a 30°C.

Le cellule batteriche dopo la crescita sono state raccolte e lisate. Al supernatante è stato aggiunto un appropriato volume di biglie coniugate con glutatione (Promega) ed incubate a 30°C per 3h.

Dopo i lavaggi le proteine sono state purificate dalle biglie con 200ul di Elution buffer (Promega). Il complesso biglie-proteine è stato bloccato per 1 h con 5% di BSA in PBS 1X a 4°C ed incubate con 10ul della proteina DAXX radiomarcato prodotta con il sistema della TNT (Promega).

Dopo vari lavaggi con 1% di Nonidet P-40 in 1X PBS il complesso GST-proteina DAXX è stato rimosso per competizione utilizzando 20ul di Elution Buffer.

A 10ul di eluato è stato addizionato 4ul di Sample buffer e analizzato in un gel SDS al 12%. Il gel è stato fissato ed essiccato e visualizzato tramite autoradiografia.

RISULTATI

L'obiettivo del nostro studio è stato quello di caratterizzare alcuni dei possibili partner proteici che interagiscono con la proteina AIRE e che costituiscono il complesso multiproteico con cui essa esplica il suo ruolo biologico. La ricerca delle proteine di interazione potrebbe contribuire a chiarire quali siano i meccanismi che regolano la sua attività come regolatore della trascrizione e quali processi biochimici siano coinvolti nella sua regolazione.

Per caratterizzare i possibili partner proteici di AIRE, abbiamo avviato uno studio di interazione proteina-proteina basato sulla tecnica dei Due Ibridi in cellule di lievito. Con questa tecnica è stato possibile "screenare" una libreria di cDNA di timo umano ed abbiamo potuto stabilire che circa l'84% dei cloni risultati positivi all'interazione con AIRE (1-524), contenevano il cDNA che codifica per la stessa proteina AIRE, circa il 12% contenevano il cDNA codificante per proteine coinvolte nel processo di sumoilazione ed il restante 4% apparteneva a dei cloni la cui sequenza è stata attribuita a geni con varie funzioni.

Sette di questi ultimi cloni positivi codificano per la regione C-terminale della proteina DAXX (Death domain associated protein) (aa 629-740) corrispondente al Ser/Prot/Thr“rich-domain”.

Proteina DAXX

DAXX è una proteina che partecipa a numerose funzioni cellulari, essa è ubiquitaria ma con una espressione particolarmente alta a livello del timo e dei testicoli (Yang X. et al., 1997).

A livello cellulare si trova espressa prevalentemente nella membrana nucleare o in distinte strutture nucleari, i PML-NBs (PromyelocyticLeukemiaNuclearBodies), dove insieme alla PromyelocyticLeukemiaprotein (PML) influenza fenomeni di apoptosi (Ishov AM. et al., 1999). Il fatto che diverse proteine che interagiscono con DAXX non siano localizzate esclusivamente nei PML-NBs, indica che DAXX si localizza anche in altre strutture nucleari.

La funzione di DAXX è rimasta a lungo sconosciuta.

Inizialmente DAXX è stata identificata come proteina legante il dominio "death" di Fas o CD95 o APO-1. Fas è un recettore di membrana la cui funzione è quella di indurre la morte cellulare. L'attivazione di questo recettore avviene attraverso il legame, sulla superficie cellulare, con il ligando corrispondente (FASL). Fas possiede anche, nella porzione citosolica, un dominio strutturale denominato Death domain che induce l'apoptosi attraverso l'interazione con altre proteine. Attraverso studi di interazione è stato visto che Daxx è in grado di legare questo dominio strutturale e di incrementare l'apoptosi mediata da FAS (Yang, F et al. 1997).

Successivamente attraverso la produzione di topi “knoch out” Daxx $-/-$ è stata dimostrata una funzione antiapoptotica. Infatti questi modelli murini non mostravano disordini iperproliferativi come ci si aspetterebbe dalla mancanza di un gene pro apoptotico, ma mostravano un’alta mortalità embrionale causata da una diffusa apoptosi in tutte le cellule. Questi dati nel loro insieme indicano che Daxx mostra una funzione anti-apoptotica che è essenziale per lo sviluppo embrionale (Michaelson JS. et al., 1999).

Daxx possiede anche la funzione di co-repressore trascrizionale che esplica nei compartimenti nucleari attraverso l’interazione con numerosi fattori di trascrizione e proteine coinvolte nella repressione trascrizionale.

Dal punto di vista molecolare la proteina DAXX, è un regolatore trascrizionale, essa agisce soprattutto reprimendo l’attività di vari geni target.

E’ stato evidenziato che essa prende parte sia al complesso multi-proteico del quale fanno parte le deacetilasi istoniche (HDACs) (Hollenbach AD. et al.,1999) sia ai complessi di rimodellamento della cromatina che includono la proteina ATRX (Xue Y. et al., 2003); (Tang J.et al., 2004). La proteina DAXX quindi regola i processi cellulari modulando la repressione trascrizionale di geni specifici in differenti condizioni. Inoltre la proteina DAXX, si può trovare associata alla proteina CBP sumoilata di cui ne reprime l’attività trascrizionale attraverso il reclutamento dell’istone deacetilasi 2 (HDAC2) (Kuo, H. et al., 2005).

Poiché DAXX si associa direttamente a diversi fattori di trascrizione, tra cui Pax3 e Pax5, p53, p73 e p63, i recettori per i glucocorticoidi e per gli androgeni, è probabile che essa possa agire da proteina di collegamento tra i fattori di trascrizione che legano il DNA e complessi coinvolti nella repressione trascrizionale (Hollenbach AD et al. 1999), (Li H. et al., 2000), (Li R. et al. 2000), (Zhao, LY et al. 2004), (Muromoto R. et al. 2008).

La repressione trascrizionale mediata da DAXX è quindi dovuta alla sua interazione con il complesso delle HDAC2 (Hollenbach AD. et al., 2002), infatti DAXX con il suo "Death domain associated protein" (aa 629-740) corrispondente al Ser/Prot/Thr"rich-domain", lega le deacetilasi istoniche portando la cromatina ad uno stato inattivo con conseguente repressione trascrizionale.

IL DOMINIO HSR/CARD DI AIRE INTERAGISCE COL S/P/T RICH DOMAIN DI DAXX

Per definire la porzione della proteina AIRE responsabile dell'interazione con DAXX sono stati effettuati dei test di interazione diretta eseguiti mediante cotrasformazioni in cellule di lievito di DAXX espresso come proteina di fusione con il GAL4 Activation Domain e costrutti di AIRE comprendenti specifici domini della proteina espressi come proteine di fusione con il GAL4 DNA Binding Domain.

Abbiamo utilizzato 6 costrutti di AIRE mancanti della porzione ammino-terminale e della porzione carbossi-terminale e un costrutto mutato (W78R) nel dominio HSR/CARD (Fig15).

Solo i costrutti contenenti la porzione N-terminale intatta di AIRE sono capaci di interagire con la proteina DAXX. Questa regione, comprendente gli aa 1-161 contiene sia il dominio HSR/CARD che il motivo Nuclear Localization Signal. Il costrutto che contiene solo il dominio HSR/CARD non è in grado di interagire con DAXX, probabilmente perché l'assenza del NLS impedisce la corretta localizzazione di AIRE necessaria all'interazione con DAXX. D'altronde studi precedenti hanno mostrato chiaramente come le mutazioni specifiche dell'NLS impediscono alla proteina di entrare nel nucleo (Ilmarinen T. et al., 2006). Il costrutto di AIRE che presenta la mutazione W78R non è in grado di omodimerizzare (Halonen M. et al. 2004) e non interagisce con DAXX. Questo sottolinea ancora l'importanza dell'HSR/CARD domain.

Abbiamo quindi ipotizzato che per l'interazione tra AIRE e DAXX sia necessaria la corretta omodimerizzazione di AIRE. Per stabilire se la S/P/T "rich region" della proteina DAXX fosse l'unico dominio coinvolto nell'interazione con AIRE, abbiamo preparato, mediante mutagenesi sito-specifica, un costrutto pGAD-DAXX con un codone di stop in posizione 629. Questo costrutto, mancante degli ultimi 111 aa della regione C-terminale, non produce cloni quando viene co-trasformato con pGBKT7-AIRE (aa 1-517).

Questi risultati indicano che la S/T/P "rich region" è l'unico dominio coinvolto nell'interazione con AIRE.

Successivamente abbiamo voluto quantificare la forza dell'interazione attraverso il saggio dell' α -galattosidasi .

Come si vede dalla figura 15 il costrutto di DAXX che contiene solo il binding domain (aa 629-740) ha un'interazione tre volte maggiore rispetto al costrutto full-length. Probabilmente la struttura terziaria della proteina DAXX full-length causa un ingombro sterico che impedisce un'efficace esposizione del dominio di interazione.

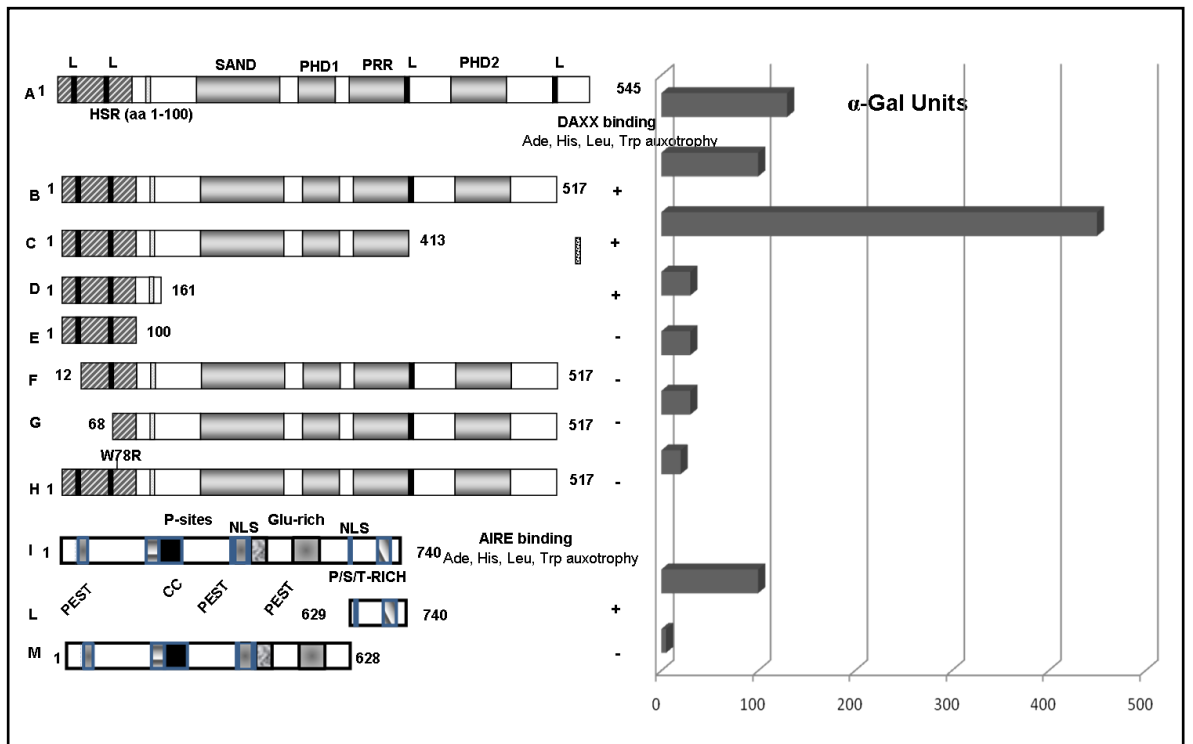


Fig 15: AIRE interagisce con DAXX nel saggio dei due ibridi di lievito.

Pannello di sinistra: Rappresentazione schematica dei costrutti di AIRE e di DAXX.

A e I: costrutti completi di AIRE e DAXX.

B : costrutto di AIRE utilizzato per “screenare” la libreria di timo umano.

C-H: costrutti di AIRE utilizzati per mappare i domini di interazione.

Pannello di destra: Saggio quantitativo della tecnica dei due ibridi mediante analisi quantitativa dell’α-Galattosidasi.

AIRE E DAXX INTERAGISCONO IN CELLULE DI MAMMIFERO

Per verificare in vivo la formazione del complesso tra AIRE e DAXX, abbiamo eseguito la tecnica della co-immunoprecipitazione in cellule di mammifero.

Abbiamo fatto esprimere in cellule transienti Cos-1 pXL5-DAXX sia con AIRE-HA intera (1-545) sia con costrutti di AIRE mancanti o della porzione N terminale (1-517) (1-413) (1-161) (1-100) o della C terminale (12-545) (68-545).

I costrutti di AIRE sono stati precipitati dai lisati cellulari mediante un anticorpo che riconosce l'epitopo legato alla proteina AIRE (anti HA) e gli immunoprecipitati (IP) sono stati analizzati attraverso Western Blotting, per verificare la presenza di DAXX. Come si vede dalla figura 16 solo i costrutti di AIRE contenenti la porzione N-terminale intatta hanno interagito con DAXX. Pertanto questi dati indicano che AIRE e DAXX interagiscono in vivo e confermano gli studi effettuati in cellule di lievito.

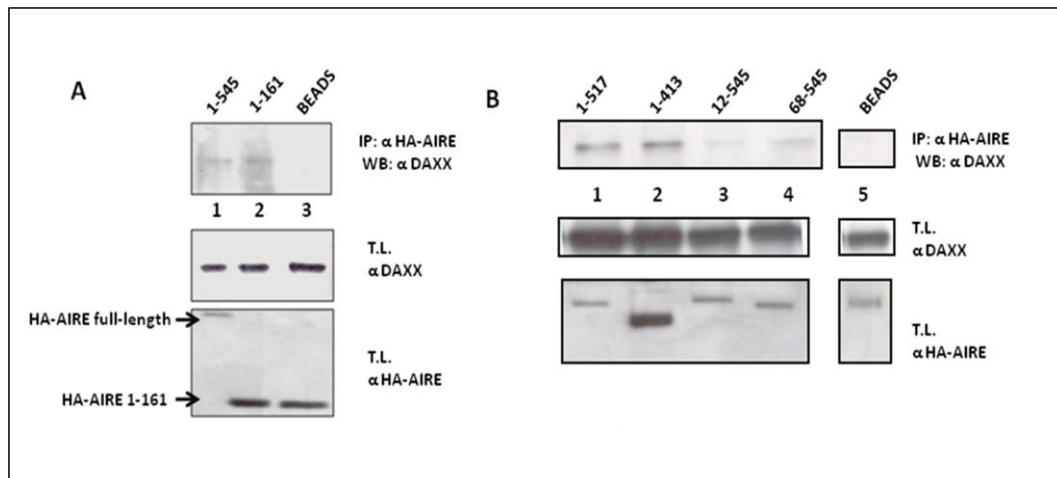


Fig.16: AIRE interagisce con DAXX in cellule di mammifero.

Solo i costrutti di AIRE con la porzione N terminale intatta sono in grado di legare DAXX.

A: Coimmunoprecipitazione di DAXX con la proteina AIRE-HA full-length (1-545) e AIRE-HA (1-161). L'immunoprecipitazione è stata eseguita utilizzando l'anticorpo anti-HA (linee 1 e 2) o solo con le biglie (linea 3). I due pannelli di sotto indicano la quantità di proteina DAXX e AIRE-HA transfettate rispettivamente.

B: Coimmunoprecipitazione di DAXX con la proteina AIRE-HA full-length (1-545) e con i costrutti di AIRE-HA mancanti della porzione C-terminale. L'immunoprecipitazione è stata eseguita con l'anticorpo anti-HA o solo con le biglie. I due pannelli di sotto indicano la quantità di proteina DAXX e AIRE-HA transfettate rispettivamente.

La coimmunoprecipitazione tra DAXX e il costrutto di AIRE che presenta solo i primi 100 aminoacidi non ha dato nessun segnale. Infatti questo costrutto non viene espresso nelle cellule di mammifero. La perdita dell'espressione è dovuta alla degradazione da parte del proteasoma della proteina AIRE 1-100 ubiquitinata. Conducendo lo stesso esperimento in presenza di un inibitore del proteosoma, MG132, le cellule esprimono questa porzione di proteina (Fig 17).

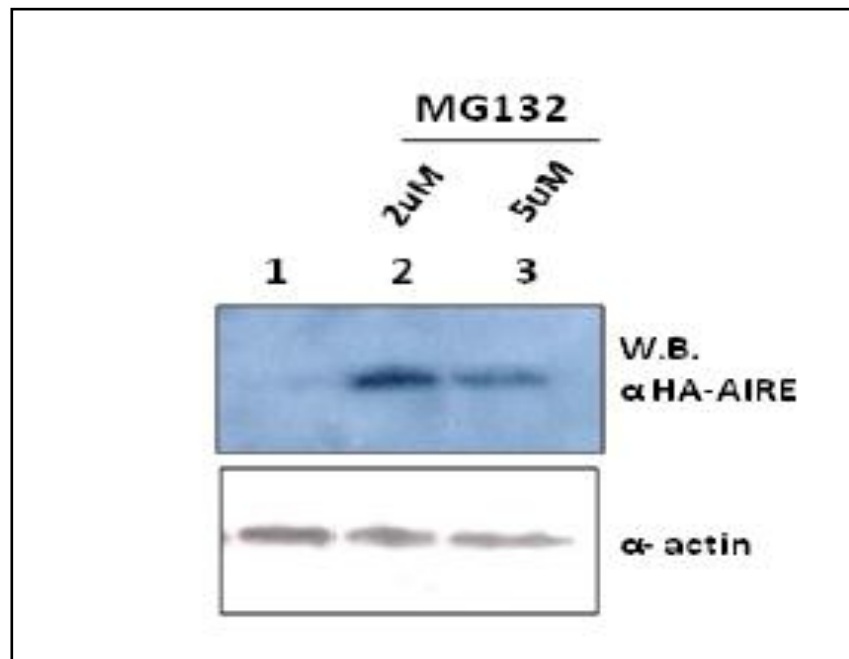


Fig.17: Il costrutto AIRE-HA (1-100) viene ubiquitinilato in cellule COS.

Le Cellule COS-1 sono state trasfettate con AIRE-HA e dopo 24 h sono state trattate con 2μM e 5μM di MG132 (linee 2 e 3) o non trattate (linea 1).

Per verificare se AIRE è in grado di interagire con DAXX endogeno abbiamo transfettato cellule COS-1, dove DAXX è altamente espresso con pcDNA 3.1 V5-AIRE.

Come si vede dalla figura 18, l'ibridazione con l'anticorpo specifico anti-DAXX sulla membrana, dove erano presenti gli immunoprecipitati anti- V5-AIRE ha dato origine ad un segnale che conferma l'interazione AIRE-DAXX.

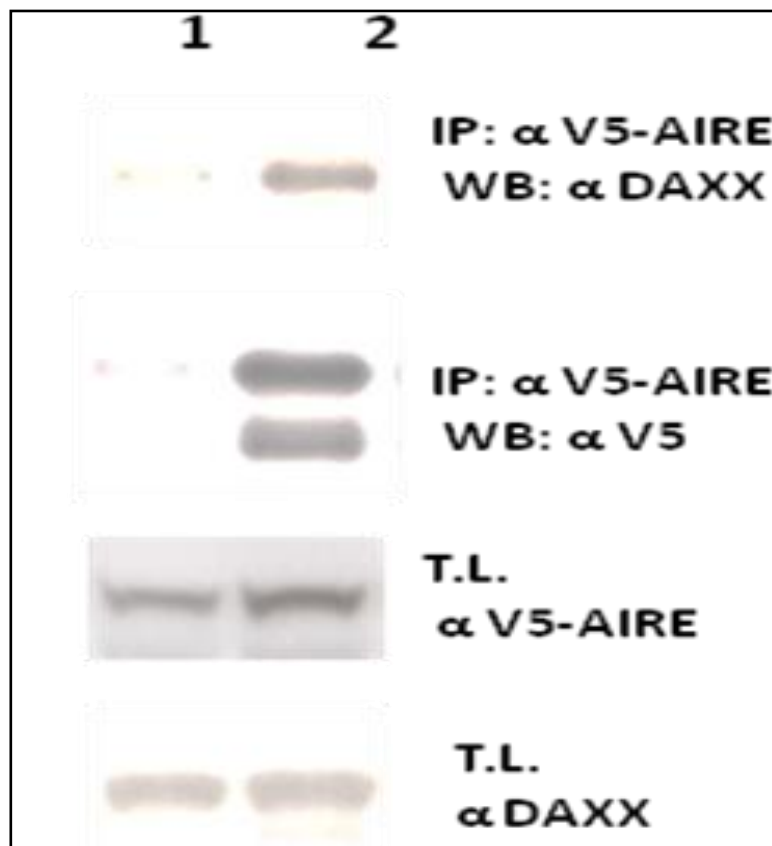


Fig.18: AIRE è in grado di coimmunoprecipitare con la proteina DAXX espressa endogenamente dalle cellule COS-1.

Le cellule COS-1. Sono state transfettate con AIRE-V5. L'immunoprecipitazione è stata eseguita utilizzando l'anticorpo anti V5 (linea 2) o solo le biglie (linea 1).

Per confermare ulteriormente l'interazione tra AIRE e DAXX abbiamo eseguito degli studi di co-localizzazione in cellule di HeLa usando il costrutto AIRE-GFP (verde). Il complesso AIRE-DAXX è stato visualizzato tramite l'anticorpo primario anti-DAXX e l'anticorpo secondario anti rabbit coniugato con il fluoro cromo Texas Red (rosso). L'immagine (arancione) rilevata dal microscopio confocale, mostra la colocalizzazione delle due proteine nel nucleo (Fig.19).

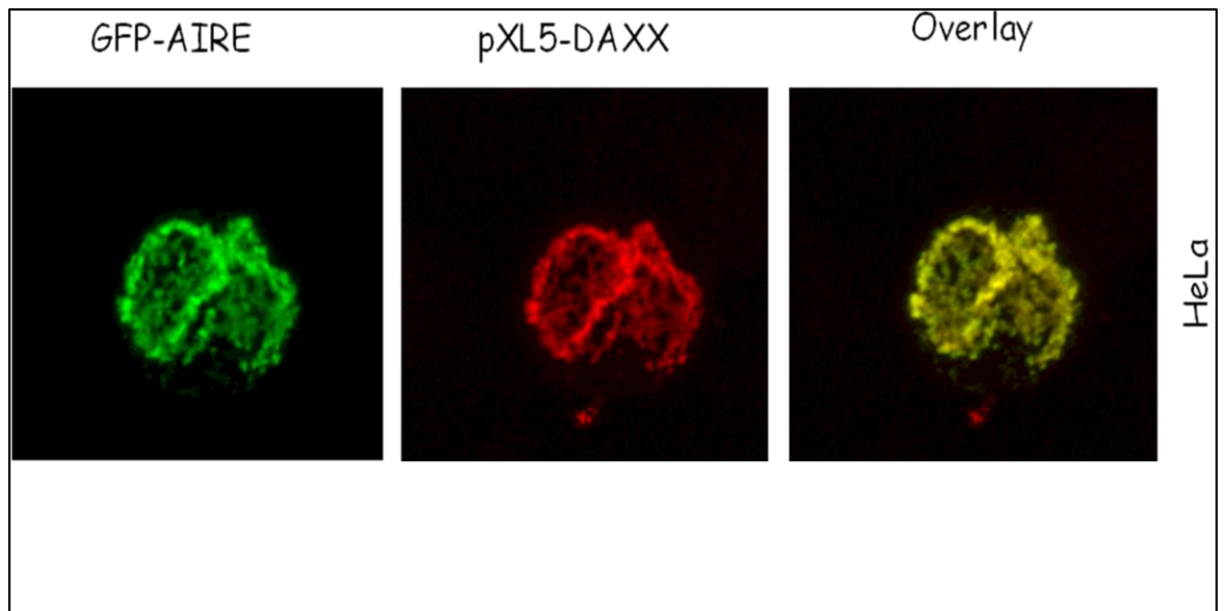


Fig.19: Colocalizzazione di AIRE-GFP e DAXX nel nucleo.

I costrutti di AIRE e DAXX sono stati transfettati in cellule HeLa e rivelati con l'anticorpo secondario anti rabbit-Texas Red.

AIRE E DAXX NON INTERAGISCONO IN VITRO

Per verificare se l'interazione tra AIRE e DAXX fosse diretta o mediata da altre proteine abbiamo eseguito il saggio del GST-pulldown. DAXX non viene copurificato insieme a GST-AIRE (dati non mostrati). I dati indicano che il legame AIRE-DAXX è un legame debole e probabilmente richiede la presenza di altre proteine che fungono da ponte.

Inoltre, la mancata interazione in vitro può essere spiegata con la mancanza di modificazioni post-traduzionali quali la fosforilazione, l'acetilazione o la sumoilazione che avvengono nei lieviti ma non nei batteri.

DAXX REPRIME LA CAPACITÀ TRANSATTIVANTE DI AIRE

Poiché DAXX ha una funzione di co-repressore trascrizionale, e vista l'interazione tra DAXX e AIRE ci ha spinto ad esaminare se DAXX potesse essere coinvolto nella regolazione dell'attività trascrizionale di AIRE.

Per stabilire il significato funzionale dell'interazione abbiamo eseguito un test di transattivazione mediante Luciferase Assay. In presenza del promotore dell'insulina, AIRE induce l'attivazione trascrizionale del gene reporter ma l'introduzione di DAXX nel sistema porta ad una repressione trascrizionale dose-dipendente.

Come mostrato nella figura 20, la sovra-espressione di DAXX ha ridotto del 70% la transattivazione del promotore dell'insulina sia nelle cellule Cos-1 che nelle cellule HeLa.

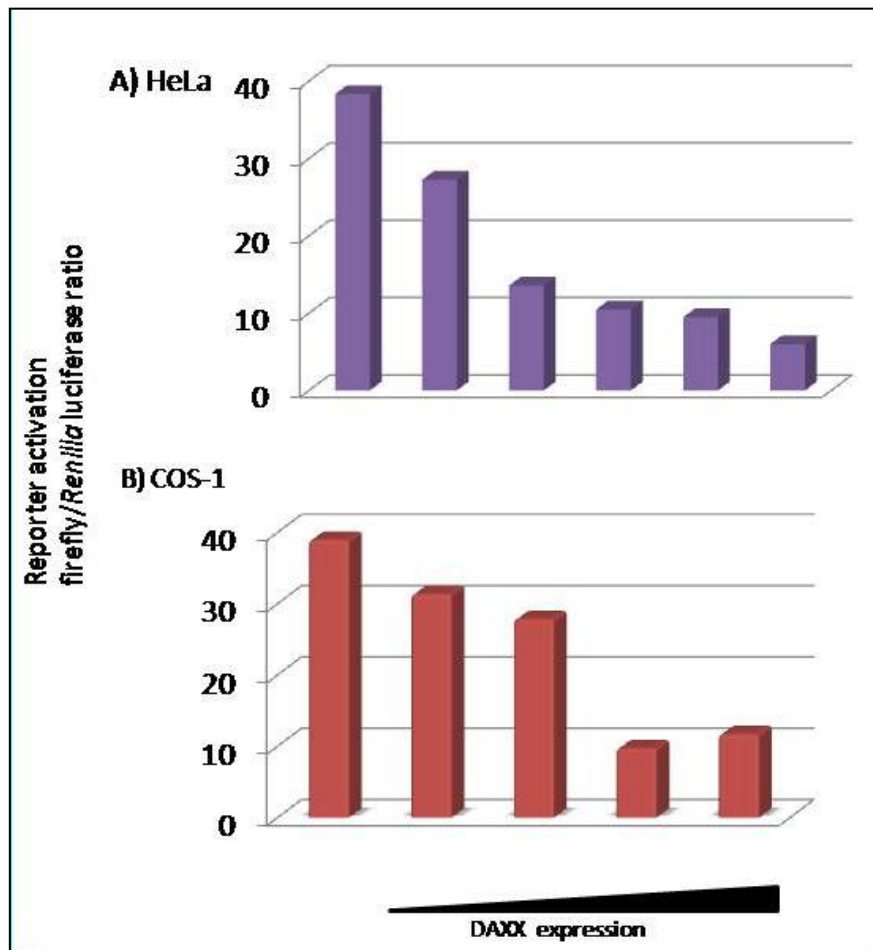


Fig.20: La proprietà transattivante di AIRE è regolata negativamente da DAXX. Attivazione del gene reporter pMG3-insulin/Luc in cellule COS(A) e cellule HeLa (B). Le cellule COS e HeLa sono state cotrasfettate con un'uguale quantità di AIRE-HA e concentrazioni crescenti di DAXX. Dopo 24h le cellule sono state raccolte ed è stata misurata l'attività luciferica.

Tale repressione risulta mediata dalle proteine con attività istone deacetilasi (HDACs) poiché conducendo lo stesso esperimento in presenza dell' inibitore delle HDAC, la Tricostatina A, si ristabilisce la capacità transattivante di AIRE (Fig 21).

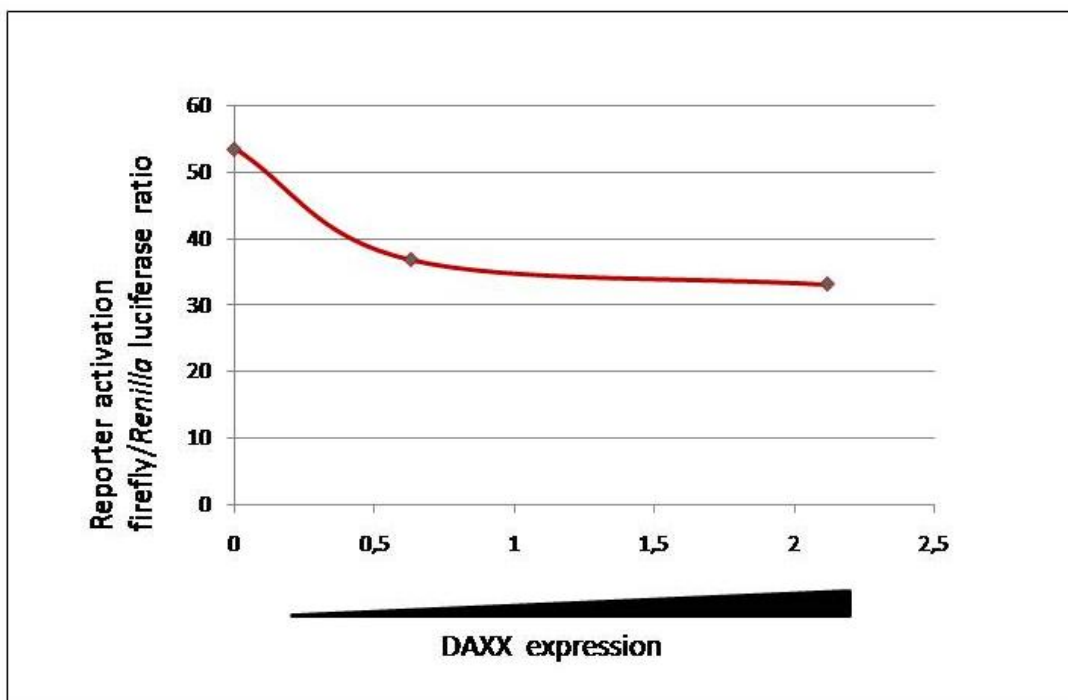


Fig. 21: La presenza di Tricostatina A abolisce la capacità di DAXX di inibire la transattivazione di AIRE.

Attivazione del gene reporter pMG3-insulin/Luc in cellule cellule Hela. Le cellule sono state cotransfettate con un'uguale quantità di AIRE-HA e concentrazioni crescenti di DAXX. Dopo 5 h dalla transfezione le cellule sono state trattate per 24h con TSA raccolta misurata l'attività luciferasica.

Per confermare il coinvolgimento delle HDAC, nella repressione di AIRE abbiamo eseguito degli esperimenti di co-immunoprecipitazione in cellule di mammifero.

Come si può vedere dalla figura 22 AIRE è in grado di interagire con le proteine HDAC1 e HDAC2, confermando l'ipotesi che le istone deacetilasi sono coinvolte nella repressione trascrizionale di AIRE mediata da DAXX.

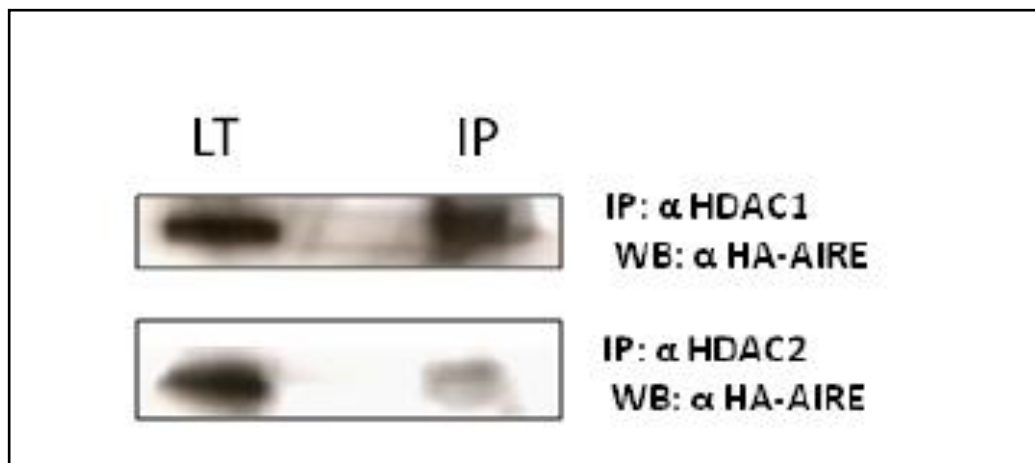


Fig. 22: Coimmunoprecipitazione delle proteine HDAC1 e HDAC2 espresse endogenamente nelle cellule COS-1 insieme ad AIRE-HA.

Le cellule COS sono state transfettate con AIRE-HA full-length. L'immunoprecipitazione è stata eseguita utilizzando l'anticorpo anti HDAC1 e HDAC2.

DAXX NON ALTERA L'OMODIMERIZZAZIONE DELLA PROTEINA AIRE

La formazione degli omodimeri è fondamentale per la proprietà transattivante di AIRE. Per verificare se la repressione mediata da DAXX alteri la formazione del complesso AIRE-AIRE abbiamo verificato se gli omodimeri di AIRE co-immunoprecipitano in cellule di mammifero anche in presenza di DAXX. Abbiamo transfettato elevate concentrazioni di AIRE- V5 e AIRE-HA in cellule di COS-1 insieme ad una crescente concentrazione di DAXX.

Come mostra la figura 23 non è evidenziabile alcun cambiamento nella formazione dell'omodimero di AIRE anche ad alte concentrazioni di DAXX.

Questo risultato dimostra che DAXX non determina la distruzione degli omodimeri di AIRE.

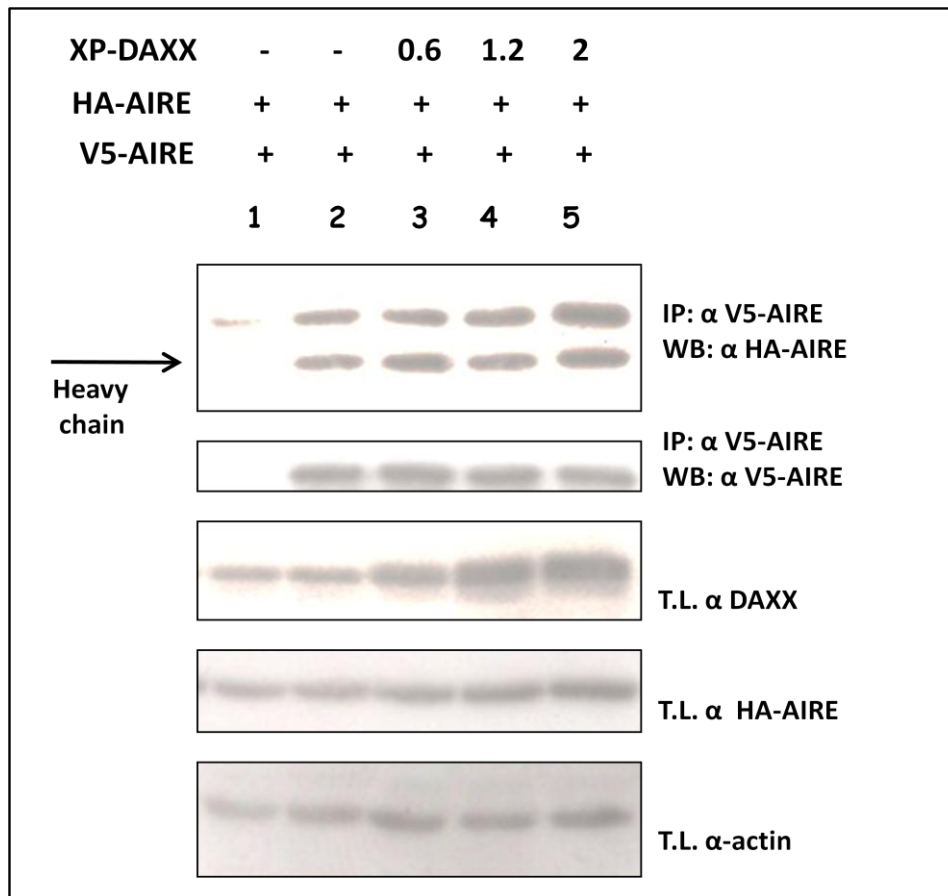


Fig.23: Test di omodimerizzazione

Cellule COS-1 sono state transfettate con AIRE-V5, AIRE-HA, e DAXX-Xpress. L'IP è stata eseguita utilizzando gli anticorpi anti V5 (linee 2-5) o solo con le biglie (linea 1). Il primo pannello mostra la formazione degli omodimeri. I pannelli di sotto mostrano la quantità di proteina transfettata.

DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo eseguito degli studi funzionali mediante la tecnica dei due ibridi in cellule di lievito, allo scopo di identificare le proteine che interagiscono con AIRE e che regolano la sua attività. La proteina AIRE (1-517aa) fusa con un DNA-Binding Domain è stata utilizzata come esca per “screenare” le proteine interagenti presenti in una libreria di cDNA di timo umano. Con questo approccio abbiamo identificato diversi cloni positivi, sette dei quali codificavano per la proteina DAXX. La proteina DAXX è stata inizialmente identificata come proteina pro apoptotica ma esperimenti successivi hanno dimostrato la sua funzione anti-apoptotica nello sviluppo embrionale. Dal punto di vista molecolare la proteina DAXX, è un regolatore trascrizionale, e agisce soprattutto reprimendo l’attività di vari geni target.

L’interazione tra AIRE e DAXX è stata confermata anche *in vivo* in cellule di mammifero attraverso esperimenti di co-localizzazione e di co-immunoprecipitazione mediante transfezioni della proteina DAXX, della proteina AIRE e dei suoi costrutti deleti.

Gli esperimenti *in vitro* di GST pull-down hanno dimostrato che l’interazione tra AIRE-DAXX è debole e probabilmente richiede l’ausilio di proteine accessorie

assemblate in complessi multiproteici. La debole interazione può essere spiegata anche con la mancanza di modificazioni post-traduzionali quali la fosforilazione, l'acetilazione o la sumoilazione che avvengono nei lieviti ma non nei batteri.

Negli esperimenti di transattivazione, si è visto come DAXX reprime fortemente l'attività trascrizionale di AIRE e che la deacetilazione degli istoni è coinvolta nella repressione trascrizionale mediata da DAXX.

Il sito di interazione della proteina DAXX con la proteina AIRE si trova nel dominio "S/P/T rich", un motivo strutturale con cui DAXX lega diverse altre proteine: Pax3, Pax5, p53, GR e HDAC2.

La proteina AIRE interagisce con il dominio S/P/T di DAXX attraverso il suo dominio HSR/CARD, un motivo fondamentale per l'omodimerizzazione, per la localizzazione nucleare e per l'attività transattivante della proteina. A riprova di ciò abbiamo eseguito studi funzionali che ci hanno permesso di provare come la mutazione W78R, frequente in alcune popolazioni italiane e localizzata in questo dominio, abolisce totalmente l'interazione tra AIRE e DAXX.

I nostri esperimenti hanno dimostrato inoltre che la repressione mediata da DAXX non influenza la formazione degli omodimeri nonostante avvenga nel dominio HSR/CARD motivo fondamentale per l'omodimerizzazione della proteina.

Questo dominio proteico è stato oggetto di numerosi studi poiché due terzi delle mutazioni missenso della proteina AIRE, identificate in pazienti APECED, sono localizzate in questo motivo. Queste osservazioni hanno suggerito che questo

dominio N-terminale, è indispensabile per il corretto funzionamento della proteina. In particolare dal nostro gruppo era stato già osservato e dimostrato in esperimenti funzionali che le mutazioni p.F77S e p.V22_D23del aboliscono l'omodimerizzazione indicando che tale processo è estremamente importante per una corretta funzione della proteina (Meloni M. et al., 2005).

Questi esperimenti confermano l'importanza del dominio HSR/CARD di AIRE nell'interazione proteina-proteina.

Recentemente attraverso studi di "computer modeling" ed analisi di omologia di sequenza, il dominio HSR è stato meglio caratterizzato e rinominato dominio CARD (CAspase Recruiment Domain).

Il CARD dominio è un motivo strutturale tipico del reclutamento delle caspasi ed appartiene ad una classe di motivi proteici strutturali denominati Death Fold che mediano le interazioni proteina-proteina nel processo apoptotico.

La caratteristica di questo dominio è la distribuzione su tutta la superficie di cariche elettrostatiche che permettono alle proteine CARD di interagire con altre proteine attraverso legami omofilici.

La nuova caratterizzazione di questo dominio ha suggerito che AIRE potesse far parte di vari complessi proteici che sicuramente coinvolgono altre proteine-CARD.

La proteina AIRE potrebbe così far parte di nuovi pathways biochimici inattesi.

Infatti le proteine Card sono coinvolte sia in pathways apoptotici che in processi di risposta infiammatoria. Inoltre alcune proteine della famiglia CARD-protein regolano l'attività di NF-kb nella risposta immunitaria sia innata che adattativa.

Poiché AIRE e DAXX sono stati precedentemente descritti come regolatori negativi di NF-kB, è probabile che il loro legame possa in qualche modo essere necessario ai pathway cellulari innescati dalle caspasi. (Pasini D. et al 2008), (Park J. et al 2007).

Saranno necessarie ulteriori studi per capire meglio e approfondire il ruolo di quest'interazione all'interno di questo processo.

E' inoltre possibile ipotizzare che l'interazione tra AIRE e DAXX moduli la regolazione trascrizionale promossa da modificazioni epigenetiche della cromatina.

DAXX è una proteina capace di legare gli istoni e le proteine con attività istone deacetilasi (HDAC) per reprimere la trascrizione di geni target, AIRE invece promuove l'espressione di geni che sono caratterizzati da bassi livelli di espressione e mancano di markers epigenetici trascrizionalmente attivi.

Nei promotori dei geni target, AIRE è in grado di legare l'istone H3K4 non modificato (H3K4me0). Successivamente a questa interazione si ha un incremento della modificazione H3K4me3 e AcH3, modificazioni istoniche associate con la cromatina attiva e una diminuzione dei livelli di H3K27me3, un marcatore epigenetico associato alla repressione trascrizionale (Agger K. et al., 2008).

Alla luce di queste evidenze possiamo ipotizzare l'esistenza di un complesso multiproteico che comprende AIRE, DAXX e le HDACs la cui attività è finemente

regolata. Secondo questo modello probabilmente AIRE è capace di reclutare specifiche H3K4 metiltransferasi che portano ad uno stato di cromatina attiva e quindi attivazione trascrizionale. Tale processo sarebbe reversibile, pertanto è necessario che in uno specifico momento AIRE venga silenziato. Probabilmente questo avviene ad opera di DAXX e delle HDACs per dar modo ai complessi H3K4-istone demetilasi di riportare gli istoni ad uno stato ipometilato e al complesso H3K27 istone metiltransferasi di instaurare la modificazione H3K27me3 che ricompatta la cromatina e porta a repressione trascrizionale.

L'esatto ruolo di AIRE nei processi di reclutamento dei complessi HDM e HMT dovrà essere investigato, ma è possibile che si instaurino delle interazioni proteina-proteina con i membri dei complessi come già dimostrato per il fattore di trascrizione T-box (Fig. 24).

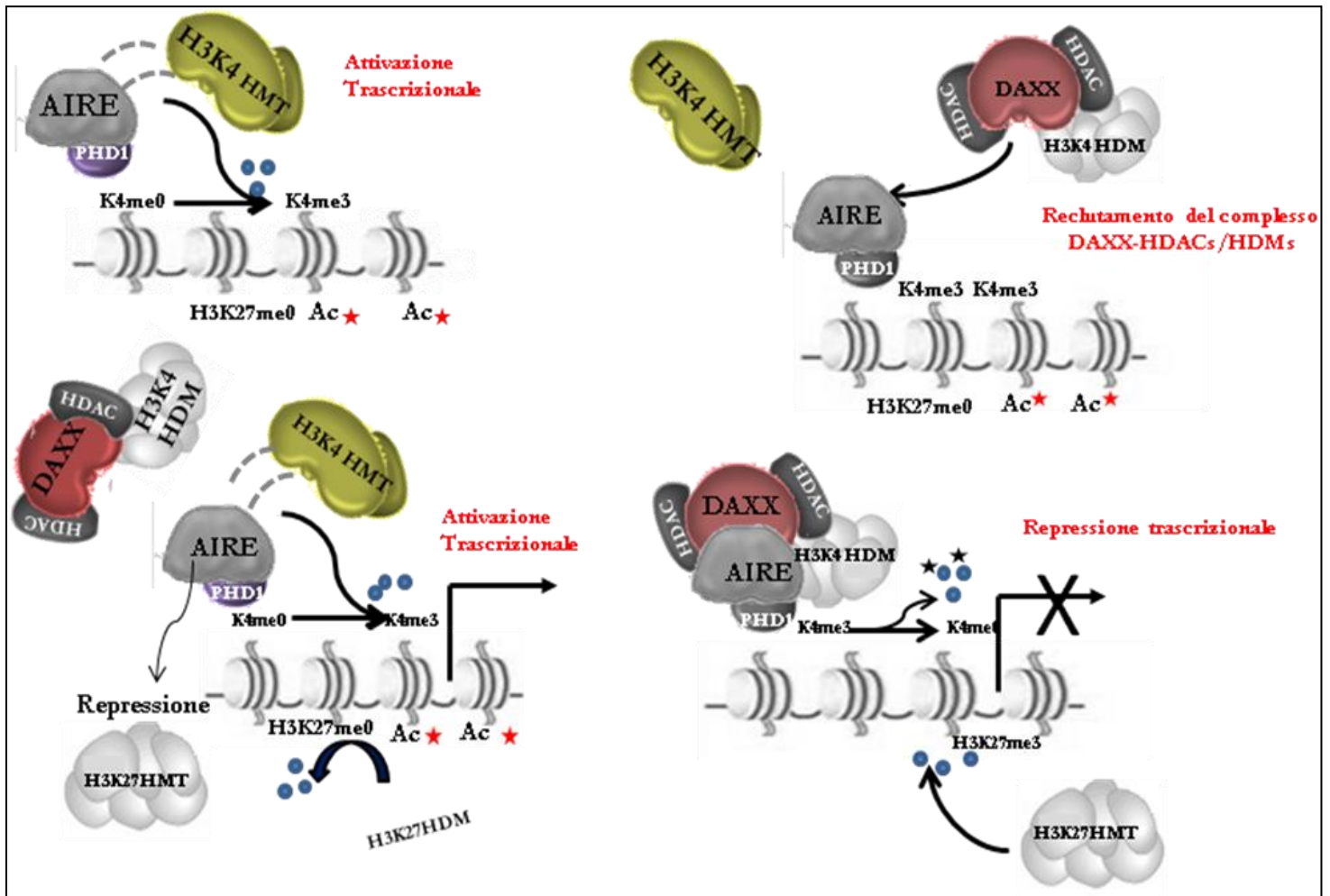


Fig. 24: Meccanismo molecolare ipotetico proposto in questo studio per l'attività

AIRE-DAXX.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

In conclusione, in questo lavoro abbiamo identificato e caratterizzato un nuovo partner di AIRE. Tale acquisizione contribuisce ad ampliare le nostre conoscenze sulla funzione della proteina AIRE e sui meccanismi che la regolano e più in generale sul pathway molecolare coinvolto nella organizzazione e nel mantenimento della tolleranza immunologica.

L'importanza di tali studi è legata alla peculiarità dell'APECED che pur assumendo caratteristiche cliniche analoghe a malattie a trasmissione poligenica è invece dovuta esclusivamente alle mutazioni di un fattore trascrizionale espresso nei tessuti linfoidei. E' evidente che la comprensione dei meccanismi di questa disregolazione immunologica può dare un contributo essenziale sui difetti comuni ad altre malattie autoimmuni più frequenti nella popolazione.

Queste conoscenze potranno contribuire allo sviluppo di nuovi trattamenti terapeutici per le malattie autoimmuni.

I nostri studi proseguono con lo studio approfondito dell'interazione con AIRE con il complesso HDAC.

Gli studi sull'acetilazione di AIRE e il suo coinvolgimento nel complesso co-repressorio con attività deacetilasica permetteranno di delineare i pathways in cui AIRE è coinvolta in particolare il suo ruolo nel complesso che dovrebbe regolare il ricompattamento dei nucleosomi (deacetilazione) dopo il passaggio dell'RNA polimerasi II e prevenire l'inizio della trascrizione criptica all'interno delle regioni codificanti. Questi dati potrebbero contribuire alla comprensione della funzione di AIRE e in particolare a definire quale sia il ruolo di questa proteina nel meccanismo di tolleranza centrale.

BIBLIOGRAFIA

Abbas AK., Lichtman AH., Pillai S.,(2010) *Immunologia cellulare e molecolare*. Elsevier-Masson.

Abramson J. et al.,(2010). Aire's partners in the molecular control of immunological tolerance. *Cell* 140: 123-35.

Agger, K. et al.,(2008). The emerging functions of histone demethylases. *Curr Opin Genet Dev* 18: 159-68.

Ahonen P. et al.,(1987). Adrenal and steroidal cell antibodies in patients with autoimmune polyglandular disease type I and risk of adrenocortical and ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 494-500.

Ahonen P. et al.,(1990). Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *N Engl J Med* 322: 1829-36.

Akiyoshi H. et al.,(2004). Subcellular expression of autoimmune regulator is organized in a spatiotemporal manner. *J Biol Chem* 279: 33984-91.

Anderson G. et al.,(2007). Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. *Nat Rev Immunol* 7: 954-963.

Anderson G, and Jenkinson EJ.(2001). Lymphostromal interactions in thymic development and function. *Nat Rev Immunol* 1: 31 -40.

Anderson MS.(2002). Autoimmune endocrine disease. *Curr Opin Immunol* 14: 760-4.

Anderson MS., et al.,(2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298: 1395-401.

Appay V. et al.,(2008). CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med* 14: 623-8.

Ardavin, C. (1997). Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 18: 350-61.

Berger SL. (1999) Gene activation by histone and factor acetyltransferases. *Curr Opin Cell Biol* 11: 336-41.

- Betterle C. et al.,(2002). Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction *Endocr Rev* 23: 327-64.
- Betterle C. et al.,(1998). Clinical review 93: Autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1049-55.
- Björser P. et al.,(2000). Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein. *Am J Hum Genet* 66: 378-92.
- Björser P. et al.,(1999). Localization of the APECED protein in distinct nuclear structures. *Hum Mol Genet* 8: 259-66.
- Blechsmidt, K. et al.,(1999). The mouse Aire gene: comparative genomic sequencing, gene organization, and expression. *Genome Res* 9: 158-66.
- Bleul CC. et al.,(2006). Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* 22: 992-6.
- Bloch DB. et al.,(2000). Sp110 localizes to the PML-Sp100 nuclear body and may function as a nuclear hormone receptor transcriptional coactivator. *Mol Cell Biol* 20: 6138-46.
- Bluestone JA. and Abbas AK.(2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3: 253-7.
- Bode AM et al.,(2005). Signal transduction pathways in cancer development and as targets for cancer prevention. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 79: 237-97.
- Bonasio R., et al.,(2006). Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol* 7: 1092-100.
- Bottomley MJ. et al.,(2001). The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation. *Nat Struct Biol* 8: 626-33.
- Bottomley, .J. et al.,(2005). NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1). Insights into autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem* 280: 11505-12.
- Bouso, P. et al.,(2002). Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* 296: 1876-1880.
- Boyd RL. et al.,(1993). The thymic microenvironment. *Immunol Today* 14: 445-59.

- Carding SR. and Egan PJ.(2002). Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity *Nat Rev Immunol* 2: 336-45.
- Caudy AA. et al.,(2007). CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 119: 482-7.
- Chen W. et al.,(2003). Conversion of peripheral CD4+CD25-naive T cells to CD4+CD25+. *J Exp Med* 198: 1875-86.
- Chun HJ. et al.,(2002). Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419: 395-9.
- Cihakova D. et al.,(2001). Novel AIRE mutations and P450 cytochrome autoantibodies in Central and Eastern European patients with APECED. *Hum Mutat* 18: 225-32.
- Collins SM. et al.,(2006). Dermatological manifestations of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis ectodermal dystrophy syndrome. *Br J Dermatol* 154: 1088-93.
- Consortium (1997). An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet* 17: 399-403.
- Coppo P. et al.,(2003). Primary Sjogren's syndrome associated agranulocytosis: a benign disorder? *Ann Rheum Dis* 62: 476-8.
- Cosgrove D.,(1991). Mice lacking MHC class II molecules. *Cell* 66: 1051-66.
- Davidson A. and Diamond B.(2001). Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 345: 340-50.
- Derbinski J. et al.,(2005). Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med* 202: 33-45.
- Derbinski J. et al.,(2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2: 1032-9.
- De Santa F. et al.,(2007). The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* 130: 1083-94.
- Dominguez M. et al.,(2006). Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in the Irish population. *J Pediatr Endocrinol Metab* 19: 1343-52.
- Dutnall RN. et al.,(2003). Cracking the histone code: one, two, three methyls, you're out! *Mol Cell* 12: 3-4.

- Egerton M. et al.,(1990). Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc Natl Acad Sci* 87:2579–2582.
- Farr AG. and Rudensky A.(1998). Medullary thymic epithelium: a mosaic of epithelial "self"? *J Exp Med* 188: 1-4.
- Ferguson BJ, et al.,(2008). AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity. *J. Biol. Chem* 283: 1723–31.
- Fontenot JD. et al.,(2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-6.
- Gallegos AM. and Bevan MJ.(2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* 200: 1039-49.
- Gao Y. et al.,(1998). Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J Exp Med* 188: 887-96.
- Gazda LS. et al.,(1995). Autoimmune diabetes: caught in the causality trap? *Immunol Cell Biol* 73: 549-51.
- Gibson TJ. et al.,(1998). The APECED polyglandular autoimmune syndrome protein, AIRE-1, contains the SAND domain and is probably a transcription factor. *Trends Biochem Sci* 23: 242-4.
- Goldrath AW. and Bevan MJ.(1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402: 255-62.
- Gotter J. and Kyewski B.(2004). Regulating self-tolerance by deregulating gene expression. *Curr Opin Immunol* 16: 741-5.
- Gotter J. et al.,(2004). Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J Exp Med* 199: 155-66.
- Gray D. et al.,(2007). Proliferative arrest and rapid turnover of thymic epithelial cells expressing AIRE. *J Exp. Me.* 204: 1039-1049.
- Grusby MJ. et al.,(1991). Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Science* 253: 1417-20.
- Gylling M. et al.,(2003). The hypoparathyroidism of autoimmune polyendocrinopathycandidiasis- ectodermal dystrophy protective effect of male sex. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4602-8.

- Gylling MT. et al.,(2000). ss-cell autoantibodies, human leukocyte antigen II alleles, and type 1 diabetes in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4434-40.
- Hager GL. et al.,(2006). Chromatin dynamics and the evolution of alternate promoter states. *Chromosome Res* 14: 107-16.
- Halonen M. et al.,(2002). AIRE mutations and human leukocyte antigen genotypes as determinants of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2568-74.
- Halonen M. et al.,(2004). APECED-causing mutations in AIRE reveal the functional domains of the protein. *Hum Mutat* 23: 245-57.
- Halonen M. et al. (2001). Subcellular location and expression pattern of autoimmune regulator (Aire), the mouse orthologue for human gene defective in autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED). *J Histochem Cytochem* 49: 197-208.
- Heath WR. et al.,(1992). Autoimmune diabetes as a consequence of locally produced interleukin-2. *Nature* 359: 547-549.
- Heery DM. et al.,(1997). A signature motif in transcriptional coactivators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387: 733-6.
- Heino M. et al.,(1999a). Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 821-5.
- Heino M. et al.,(2000). RNA and protein expression of the murine autoimmune regulator gene (Aire) in normal, RelB-deficient and in NOD mouse. *Eur J Immunol* 30: 1884-93.
- Heino M. et al., (1999b). Mutation analyses of North American APS-1 patients. *Hum Mutat* 13: 69-74.
- Hiscott J. et al.,(2006). Master CARD: a priceless link to innate immunity. *Trends Mol. Med* 12: 53-6.
- Hildeman DA. et al.,(2003). T cell apoptosis and reactive oxygen species. *J Clin Invest* 111: 575-81.
- Hogquist KA. et al.,(2005). Central tolerance: learning self control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 5: 772-782.

- Hollenbach AD. et al.,(2002).Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core histones and the chromatin-associated protein Dek. *J Cell Sci* 15: 3319-30.
- Hong L. et al.,(1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J. Biol. Chem* 5: 305-14.
- Hori S. et al.,(2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-61.
- Horsthemke B. et al.,(2006). Epimutations in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 310:45-59.
- Hubert P. et al.,(2007). The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil? *J. Leukoc Biol* 82: 781-94.
- Ilmarinen T. et al.,(2005). Functional analysis of SAND mutations in AIRE supports dominant inheritance of the G228W mutation. *Hum Mutat* 26: 322-31.
- Ilmarinen T.(2007). Functional and cellular analysis of Autoimmune Regulator (AIRE) Protein. *Publication of the National Public health Institute KTL A 17*
- Ilmarinen T.(2008). Functional interaction of AIRE with PIAS1 in transcriptional regulation. *Mol Immunol* 45: 1847-62.
- Ilmarinen T. et al.,(2006). The monopartite nuclear localization signal of autoimmune regulator mediates its nuclear import and interaction with multiple importin alpha molecules. *FEBS J* 273: 315-24.
- Ishov AM. et al.,(1999). PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1. *J Cell Biol* 18: 221-34.
- Janeway CA. et al.,(2008). *Immunobiology*. New York, NY, US and Abingdon, UK, Garland Science, Taylor&Francis group.
- Jenkinson W. et al.,(2008). Preparation of 2-dGuo-treated thymus organ cultures. *J Vis Exp* Aug 28: 18.
- Johnnidis JB. et al.,(2005). Chromosomal clustering of genes controlled by the aire transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7233-8.
- Jolicoeur C. et al.,(1994). T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 6707-6711.

Kay BK. et al.,(2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* 14: 231-41.

Khatti R. et al.,(2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337-42.

Kischkel FC. et al.,(1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14: 5579-88.

Klein L. and Kyewski B.(2000). "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J Mol Med* 78: 483-94.

Kubicek S, et al.,(2004). A crack in histone lysine methylation. *Cell*;119:903-6.

Kogawa K. et al.,(2002). Expression of AIRE gene in peripheral monocyte/dendritic cell lineage. *Immunol Lett* 80: 195-8.

Kumar PG. et al.,(2001). The autoimmune regulator (AIRE) is a DNA-binding protein *J Biol Chem* 276: 41357-64.

Kuo H et al.,(2005). SUMO modification negatively modulates the transcriptional activity of CREB-binding protein via the recruitment of Daxx. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 16973-8

Kyewski B. and Klein L.(2006). A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 24: 571-606.

Lacroix-Desmazes S. et al.,(1998). Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods* 216: 117-37.

Lalioti VS. et al.,(2002)The insulin-sensitive glucose transporter, GLUT4, interacts physically with Daxx. Two proteins with capacity to bind Ubc9 and conjugated to SUMO1. *J Biol Chem* 277: 19783-91.

Lenardo M. et al.,(1999). Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17: 221-53.

Li H. et al.,(2000). Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML. *Mol Cell Biol* 20: 1784-96.

Li R .et al.,(2000). EAP1/Daxx interacts with ETS1 and represses transcriptional activation of ETS1 target genes. *Oncogene* 19: 745-753.

- Liiv I. et al.,(2008). DNA-PK contributes to the phosphorylation of AIRE: importance in transcriptional activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1783: 74–83.
- Lind EF. et al.,(2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J. Exp Med* 194: 127-34.
- Ling PD. et al.,(2005). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *Embo J* 24: 3565-75.
- Linsk R. et al.,(1989). Are tissues a patch quilt of ectopic gene expression? *Science* 246: 261.
- Liston A. and Rudensky AY.(2007). Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 19: 176-85.
- Liston A. et al.,(2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 4: 350-4.
- Lleo A. et al.,(2008). Is autoimmunity a matter of sex? *Autoimmun Rev.*7: 626-30.
- Marrack P. et al.,(2001). Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med* 7: 899-905.
- Mathis D. and Benoist C. (2009). AIRE. *Ann. Rev. Immunol* 27: 287-312.
- Meager A. et al.,(2006). Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med* 3: 289.
- Meloni, A. et al.,(2005). Two novel mutations of the AIRE protein affecting its homodimerization properties. *Hum Mutat* 25: 319.
- Meloni A. et al.,(2008). Role of PHD fingers and COOH-terminal 30 amino acids in AIRE transactivation activity. *Mol Immunol* 45: 805-9.
- Meloni, A. et al.,(2002). Delineation of the molecular defects in the AIRE gene in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients from Southern Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 841-6.
- Michaelson JS. et al.,(1999). Genes Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev* 13: 1918-23.
- Mittaz L. et al.,(1999). Isolation and characterization of the mouse Aire gene. *Biochem Biophys Res Commun* 255: 483-90.

- Moller A. et al.,(2003). Sp100 is important for the stimulatory effect of homeodomain-interacting protein kinase-2 on p53-dependent gene expression. *Oncogene* 22: 8731-7.
- Moser B. et al.,(2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25: 75-84.
- Muromoto R. et al.,(2008). Sumoylation of Daxx regulates IFN-induced growth suppression of B lymphocytes and the hormone receptor-mediated transactivation. *Epigenetics* 3: 310–314.
- Nagamine K. et al.,(1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet* 17:393-8. *Nat Immunol* 4: 350–354.
- Neufeld M. et al.,(1980). Autoimmune polyglandular syndromes. *Pediatr Ann* 9: 154-62.
- Neufeld, M. et al.,(1981). Two types of autoimmune Addison's disease associated with different polyglandular autoimmune (PGA) syndromes. *Medicine (Baltimore)* 60: 355-62.
- Nishizuka Y. and Sakakura T.(1969). Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science* 166: 753.
- Norio R. et al.,(1973). Hereditary diseases in Finland; rare flora in rare soul. *Ann Clin Res* 5: 109-41.
- Ochsenbein, AF. and Zinkernagel RM.(2000). Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today* 21: 624-30.
- Org T. et al.,(2008). The autoimmune regulator PHD finger binds to non-methylated histone H3K4 to activate gene expression. *Embo Rep* 9: 370-6.
- Ochsenbein AF, and Zinkernagel RM. (2000). Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today* 21: 624-30.
- Oven I. et al.,(2007). AIRE recruits P-TEFb for transcriptional elongation of target genes in medullary thymic epithelial cells. *Mol Cell Biol* 27: 8815-23.
- Pasini D. et al.,(2008). Coordinated regulation of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and Polycomb-Repressive Complex 2. *Genes Dev* 22: 1345-55.
- Park J. et al.,(2007). Inhibition of NF-kappaB acetylation and its transcriptional activity by Daxx. *J Mol Biol* 368: 388-97.

- Pearce SH. et al.,(1998). A common and recurrent 13-bp deletion in the autoimmune regulator gene in British kindreds with autoimmune polyendocrinopathy type 1. *Am J Hum Genet* 63: 1675-84.
- Pearse G.(2006). Normal structure, function and histology of the thymus. *Toxicol Pathol* 34: 504-1.
- Perheentupa J.(1972). Suomalainen tautiperintö (Symposium on inherited disease in Finland). *Duodecim* 88: 1–166.
- Perheentupa, J.(1980). Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). In *Population structure and genetic disorders*, (ed. A. W. Eriksson, H. R. Forsius, H. R. Nevanlinna, P. L. Workman and R. K. Norio) 583-588. London: Academic Press.
- Perheentupa J.(2006). Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2843-50.
- Peterson P.(2009). *Hum. Mol. Genet* 18: 4699–4710.
- Peterson P. and Peltonen L.(2005). Autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1 (APS1) and AIRE gene: new views on molecular basis of autoimmunity. *J Autoimmun* 25: 49-55.
- Peterson CL et al.,(2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol* 27: R546-51.
- Petrie HT. (2003). Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis the thymus. *Nat Rev Immunol* 3: 859-66.
- Pitkänen J. et al. in,(2000). The autoimmune regulator protein has transcriptional transactivating properties and interacts with the common coactivator CREB-binding protein. *J Biol Chem* 275: 16802-9.
- Pitkänen J. et al.,(2005). Cooperative activation of transcription by autoimmune regulator AIRE and CBP. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 944-53.
- Pitkänen J et al.,(2001). Subcellular localization of the autoimmune regulator protein. characterization of nuclear targeting and transcriptional activation domain. *J Biol Chem* 276: 19597-602.
- Pontynen N. et al.,(2008). Critical immunological pathways are downregulated in APECED patient dendritic cells. *J. Mol. Med* 86:1139–52.
- Powell BR. et al.,(1982). An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatalinfection in infancy. *J Pediatr* 100: 731-7.

- Purohit S. et al.,(2005). Mapping DNA-binding domains of the autoimmune regulator protein. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 939-44.
- Reiner SL. (2007). Development in motion: helper T cells at work. *Cell* 129: 33-6.
- Rinderle C. et al.,(1999). AIRE encodes a nuclear protein co-localizing with cytoskeletal filaments: altered sub-cellular distribution of mutants lacking the PHD zinc fingers. *Hum Mol Genet* 8: 277-90.
- Rodewald HR. (2008). Thymus organogenesis. *Annu Rev Immunol* 26: 355-88.
- Rocken M. and Shevach EM. (1996). Immune deviation--the third dimension of non deletional Tcell tolerance. *Immunol Rev* 149: 175-94.
- Roifman CM.(2000). Human IL-2 receptor alpha chain deficiency. *Pediatr Res* 48: 6-11.
- Rosatelli MC. et al.,(1998). A common mutation in Sardinian autoimmune polyendocrinopathycandidiasis- ectodermal dystrophy patients. *Hum Genet* 103: 428-34.
- Ruan QG. et al.,(2007). The Autoimmune Regulator directly controls the expression of genes critical for thymic epithelial function. *J of Immunol* 178: 7173-7180.
- Sakaguchi S.(2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-62.
- Sakaguchi S.(2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6: 345-52.
- Sakaguchi S. et al.,(1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 15: 1151-64.
- Savkur RS. and Burris TP.(2004). The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *J Pept Res* 63: 207-12.
- Schwartz RH.(2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21: 305-34.
- Scott HS. et al.,(1998). Common mutations in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients of different origins. *Mol Endocrinol* 12: 1112-9.
- Sharfe N., et al.,(1997). An interleukin-2 receptor gamma chain mutation with normal thymus morphology. *J Clin Invest* 100: 3036-43.

- Shevach EM. et al.,(2008). The critical contribution of TGF-beta to the induction of Foxp3 expression and regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 38: 915-7.
- Shi Y.et al.,(2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 29:941-53.
- Shores EW. et al.,(1991). Disorganization and restoration of thymic medullary epithelial cells in T cell receptor-negative scid mice: evidence that receptor-bearing lymphocytes influence maturation of the thymic microenvironment. *Eur J Immunol* 21: 1657-61.
- Sinemus A.(2010). Promiscuous gene expression in the thymic medulla- on regulation at the epigenetic and single cell level. Inagural-Dissertation.
- Sillanpää N. et al.,(2004). Autoimmune regulator induced changes in the gene expression profile of human monocyte-dendritic cell-lineage. *Mol Immunol* 41: 1185-98.
- Starr TK. et al., (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 21: 139-76.
- Steger DJ. et al.,(1996). Remodeling chromatin structures for transcription: what happens to the histones? *Bioessays* 18:875-84.
- Strahl BD and Allis CD.(2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 6;403: 41-5.
- Sternsdorf T. et al.,(1999). The nuclear dot protein sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers. *J Biol Chem* 274: 12555-66.
- Stolarski B., et al.,(2006). Molecular background of polyendocrinopathy-candidiasisectodermal dystrophy syndrome in a Polish population: novel AIRE mutations and an estimate of disease prevalence. *Clin Genet* 70: 348-54.
- Straus SE. et al.,(1999). An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med* 130: 591-601.
- Surdo PL. et al.,(2003). Crystal structure and nuclear magnetic resonance analyses of the SAND domain from glucocorticoid modulatory element binding protein-1 reveals deoxyribonucleic acid and zinc binding regions. *Mol Endocrinol* 17: 1283-95.
- Takahama Y (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6:127-35.

- Tani M (2004). Correlation between histone acetylation and expression of the MYO18B gene in human lung cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer* 40: 146-51.
- Tang J. et al.,(2006). AIRE recruits multiple transcriptional components to specific genomic regions through tethering to nuclear matrix. *Mol Immunol* 43: 335-45.
- Tang J. et al., (2004). A novel transcription regulatory complex containing death domain-associated protein and the ATR-X syndrome protein. *J Biol Chem* 279: 20369-77.
- Tao Y. et al.,(2006) AIRE recruits multiple transcriptional components to specific genomic regions through tethering to nuclear matrix. *Mol Immunol* 43: 335-45.
- Tseng SY. and Dustin ML.(2002). T-cell activation: a multidimensional signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 14: 575-80.
- Uchida D. et al.,(2004). AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase. *J Exp Med* 199: 167-72.
- Ueno T. et al.,(2004). CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* 200: 493-505.
- Ulmanen I. et al.,(2005). Monogenic autoimmune diseases lessons of self-tolerance. *Curr Opin Immunol* 17: 609-15.
- van Ewijk W. et al.,(2000). Developing thymocytes organize thymic microenvironments. *Curr Top Microbiol Immunol* 251:125-32.
- van Ewijk W. et al.,(1994). Crosstalk in the mouse thymus. *Immunol Today* 15:214-7.
- Van Parijs L. and Abbas AK.(1998). Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280: 243-8.
- von Herrath MG. et al.,(1994). How virus induces a rapid or slow onset insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model. *Immunity* 1: 231-242.
- Walker LS. and Abbas AK.(2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2: 11-9.
- Walsh CM. et al.,(2003). The "fuzzy logic" of the death-inducing signaling complex in lymphocytes. *J Clin Immunol* 23: 333-53.
- Wang, CY. et al.,(1998). Characterization of mutations in patients with autoimmune polyglandular syndrome type 1 (APS1). *Hum Genet* 103: 681-685.

- Wang CY. et al.,(1999a). Cloning of Aire, the mouse homologue of the autoimmune regulator (AIRE) gene responsible for autoimmune polyglandular syndrome type 1 (ASP1). *Genomics* 55: 322-6.
- Wasylyk C. et al.,(2002). Sp100 interacts with ETS-1 and stimulates its transcriptional activity. *Mol Cell Biol* 22: 2687-702.
- Watanabe-Fukunaga R. et al.,(1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314-7.
- Watanabe N. et al.,(2004). Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol* 5: 426-34.
- Watanabe N. et al.,(2005). Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 436: 1181-5.
- Wing K. et al.,(2006). Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int Immunol* 18: 991-1000.
- Wolff AS. et al.,(2007). Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 in Norway: phenotypic variation, autoantibodies, and novel mutations in the autoimmune regulator gene. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 595-603.
- Wong J. et al.,(1996). Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* 98: 1107-13.
- Xue Y. et al.,(2003).The ATRX syndrome protein forms a chromatin remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*.100: 10635-40.
- Yang X. et al.,(1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 89, 27;89: 1067-76.
- Yordy JS. et al.,(2005). SP100 inhibits ETS1 activity in primary endothelial cells. *Oncogene* 24: 916-31.
- Zhang M. et al.,(2003). T cell tolerance to a neo-self antigen expressed by thymic epithelial cells: the soluble form is more effective than the membrane-bound form. *J Immunol* 170: 3954-62.
- Zhao LY. et al.,(2003). Adenovirus E1B 55-kilodalton oncoprotein binds to Daxx and eliminates enhancement of p53-dependent transcription by Daxx. *J. Viro.* 77: 11809-21.

Zhou S. et al.,(1990). Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* 344:742-6.

Zijlstra M, et al.,(1990). Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* 19: 742-6.

Zlotogora J. and Shapiro MS.(1992). Polyglandular autoimmune syndrome type I among Iranian Jews. *J Med Genet* 29: 824-6.

Zuklys S.et al.,(2000). Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *J Immunol* 165: 1976-83.

Ringraziamenti

*Desidero ringraziare la Prof. ssa M.C. Rosatelli per la disponibilità e cortesia.
Credo possa fargli piacere sapere che per me rappresenta un punto di riferimento importante non solo a livello professionale.
Grazie ad Alessandra Meloni consulente insostituibile, per avermi sempre aiutato ed incoraggiato soprattutto in occasione di alcuni momenti difficili e a Valeria Faà, per la gentilezza sempre dimostrata nei miei confronti.
Desidero infine esprimere la mia gratitudine ad Antonella Contini per avermi aiutato soprattutto negli ultimi giorni di stesura della tesi.*