



## **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE**

### **XXVI° CICLO DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO**

I pazienti con Sindrome di DiGeorge e delezione di Crkl mostrano una  
sbilanciata risposta proliferativa legata alla riduzione del fattore trascrizionale  
c-Fos

**SETTORE SCIENTIFICO-DISCIPLINARE: MED/03**

DOTTORANDO

**Dr. Mauro Giacomelli**

COORDINATORE

**Prof.ssa Giuliana Decorti**

SUPERVISORE

**Prof. Raffaele Badolato**

**ANNO ACCADEMICO 2012 / 2013**

A tutte le "Bande di Fratelli" e a coloro che comprendono come, lavorare insieme per un obiettivo, possa portare benefici anche al singolo .... al contrario dei tanti che conoscono solo il concetto del "Mors Tua Vita Mea" ....

- Westmoreland: I loro combattenti saranno almeno sessantamila
- Bedford: Cinque contro uno e in oltre loro sono tutti freschi
- Exeter: È una lotta impari
- Westmoreland: O se avessimo qui con noi almeno diecimila di quegli inglesi che oggi in patria se ne stanno sfaccendati
- Re Enrico: Chi è mai che desidera questo? Mio cugino Westmoreland?

No, mio caro cugino. Se è destino che si muoia, siamo già in numero più che sufficiente; e se viviamo, meno siamo e più grande sarà la nostra parte di gloria. In nome di Dio, ti prego, non desiderare un solo uomo di più. Anzi, fai pure proclamare a tutto l'esercito che chi non si sente l'animo di battersi oggi, se ne vada a casa: gli daremo il lasciapassare e gli metteremo anche in borsa i denari per il viaggio. Non vorremmo mai morire in compagnia di alcuno che temesse di esserci compagno nella morte.

Oggi è la festa dei Santi Crispino e Crispiano; colui che sopravvivrà quest'oggi e tornerà a casa, si leverà sulle punte sentendo nominare questo giorno, e si farà più alto, al nome di Crispiano. Chi vivrà questa giornata e arriverà alla vecchiaia, ogni anno alla vigilia festeggerà dicendo: "Domani è San Crispino". Poi farà vedere a tutti le sue cicatrici, e dirà: "Queste ferite le ho ricevute il giorno di San Crispino".

Da vecchi si dimentica, e come gli altri egli dimenticherà tutto il resto, ma ricorderà con grande fierezza le gesta di quel giorno. Allora i nostri nomi, a lui familiari come parole domestiche - Enrico il re, Bedford ed Exeter, Warwick e Talbot, Salisbury e Gloucester - saranno nei suoi brindisi rammentati e riviviranno questa storia. Ogni brav'uomo racconterà al figlio, e il giorno di Crispino e Crispiano non passerà mai, da quest'oggi, fino alla fine del mondo, senza che noi in esso non saremo menzionati.

**Noi pochi. Noi felici pochi. Noi manipolo di fratelli. Poiché chi oggi verserà il suo sangue con me sarà mio fratello,**

e per quanto umile la sua condizione, sarà da questo giorno elevata, e tanti gentiluomini ora a letto in patria si sentiranno maledetti per non essersi trovati qui oggi, e menomati nella loro virilità sentendo parlare chi ha combattuto con noi questo giorno di San Crispino!»

William Shakespeare,  
Enrico Quinto,  
atto quarto, scena terza

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>Pag 4</b>
<b>Riassunto</b>	<b>Pag 5</b>
<b>Parole chiave</b>	<b>Pag 6</b>
<b>Introduzione al presente studio</b>	<b>Pag 7</b>
<b>Sindrome di DiGeorge (del22q11)</b>	<b>Pag 9</b>
<b>Note Introduttive alla del22q11</b>	<b>Pag 9</b>
<b>Caratteristiche specifiche della del22q11</b>	<b>Pag 12</b>
<b>Crkl</b>	<b>Pag 19</b>
<b>OBIETTIVI</b>	<b>Pag 21</b>
<b>Scopo del lavoro</b>	<b>Pag 22</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>Pag 23</b>
<b>Pazienti</b>	<b>Pag 24</b>
<b>Colture cellulari</b>	<b>Pag 24</b>
Generazione di Blasti T (PHA-T cells)	<b>Pag 24</b>
Coltura di cellule Jurkat (Jurkat T cell lines)	<b>Pag 25</b>
Coltura di Linfociti T CD4+	<b>Pag 25</b>
<b>Analisi Citometrica</b>	<b>Pag 27</b>
Saggio proliferativo	<b>Pag 27</b>
Saggio di apoptosi	<b>Pag 27</b>
Analisi di Markers di attivazione cellulare	<b>Pag 28</b>
<b>Western blot</b>	<b>Pag 29</b>
<b>Analisi in Real-time (RT-PCR)</b>	<b>Pag 30</b>
<b>Silenziamento con siRNA specifico per</b>	<b>Pag 32</b>

<b>Crkl</b>	
<b>Analisi statistica</b>	<b>Pag 34</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>Pag 35</b>
<b>Pazienti</b>	<b>Pag 36</b>
<b>Diminuiti livelli di Crkl e fosfo-Crkl in pazienti con del22q11</b>	<b>Pag 38</b>
<b>Sbilanciamento della proliferazione, alterata espressione dei markers di attivazione e decrementata apoptosi nei pazienti con del22q11</b>	<b>Pag 40</b>
<b>IL-2 e TCR attivano fortemente Crkl</b>	<b>Pag 44</b>
<b>IL-2 e il triggering del TCR modulano l'espressione di Crkl</b>	<b>Pag 46</b>
<b>c-Fos e la fosforilazione di stat5 sono ridotti in pazienti con del22q11</b>	<b>Pag 46</b>
<b>Il silenziamento di Crkl in linee Jurkat ha mostrato la riduzione dei livelli di c-Fos e un concomitante calo della proliferazione</b>	<b>Pag 48</b>
<b>Analisi di espressione di PIM-1 e CD25</b>	<b>Pag 49</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>Pag 51</b>
<b>Discussione</b>	<b>Pag 52</b>
<b>Abbreviazioni</b>	<b>Pag 56</b>
<b>Ringraziamenti</b>	<b>Pag 56</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>Pag 57</b>

# **INTRODUZIONE**

*Poniti solo quelle domande per le quali puoi trovare una risposta !*

*R. B.*

## **Riassunto**

La sindrome di DiGeorge (o del22q11.2) è una immunodeficienza primitiva, avente una incidenza di 1 / 5000 nati vivi. Essa è causata da una delezione, in eterozigosi, di un tratto del braccio lungo del cromosoma 22, di circa 3 MB.

La sindrome si accompagna a malformazioni cardiache e del tronco aortico, oltre che ad anomalie del volto e dell'arco palatino, con ipoplasia/aplasia del timo e delle paratiroidi. Oltre alle patologie cardiache gli individui affetti soffrono di tetania e convulsioni, dismorfismi facciali e immunodeficienze con infezioni ripetute sia batteriche che virali, in particolare alle vie aeree sia alte che basse. Spesso sono frequenti episodi di autoimmunità.

In generale la sindrome mostra una ampia variabilità fenotipica, anche fra individui della stessa famiglia.

Le basi delle alterazioni immunologiche di questa sindrome non sono ancora pienamente comprese e restano anzi assai vaghe.

Fra le proteine delete vi è la proteina Crkl, una proteina appartenente alla più ampia famiglia degli adattatori Crk. Crkl prende parte ad importanti processi biologici quali chemotassi, adesione, apoptosi e proliferazione.

Crkl è una proteina coinvolta infatti nel signaling di svariati fattori di crescita e citochine come SDF-1 $\alpha$ , interferoni di tipo I, GM-CSF ed IL-2. Il nostro scopo è stato quello di comprendere se le alterazioni funzionali dei linfociti T, osservabili in questa sindrome, siano correlabili alla aplo-insufficienza di Crkl.

Noi abbiamo analizzato, in un gruppo di pazienti affetti da del22q11.2 la proliferazione, l'apoptosi e l'espressione di vari markers di attivazione, nei linfociti T dopo stimolazione con IL-2 o dopo ingaggio del TCR.

Successivamente abbiamo valutato i cambiamenti nei principali fattori chiave della proliferazione, quali le cicline, nonché l'andamento di fattori trascrizionali come c-Fos e stat5, in seguito ad attivazione dei linfociti T.

Tutti i pazienti osservati presentavano una evidente riduzione della proteina totale Crkl, così come una marcata riduzione della sua forma fosforilata. La fosforilazione di Crkl è indotta principalmente da IL-2 la quale è il principale fattore proliferativo dei linfociti T.

## Introduzione

IL-2 modula anche l'espressione di Crkl sia a livello di proteina che a livello di mRNA. In aggiunta, in questi soggetti, la proliferazione dei linfociti T dopo triggering del TCR appare anch'essa ridotta, se comparata a soggetti sani di controllo.

Noi abbiamo anche osservato un decremento della fosforilazione di stat5 sempre a carico dei linfociti T dei pazienti, dopo stimolazione con IL-2. Stat5 è peraltro noto formare complessi trascrizionali con Crkl i quali complessi sono attivi in sede nucleare nella espressione di geni bersaglio. La successiva analisi dell'andamento dei fattori chiave che regolano il processo proliferativo ha rivelato un decremento nei livelli del fattore trascrizionale c-Fos, facente parte del complesso trascrizionale AP-1 e un calo, variabile nei livelli, della ciclina D3.

Questi risultati si sono anche confermati su linee Jurkat dopo silenziamento specifico di Crkl.

In conclusione la diminuita proliferazione, benchè solo parziale, osservata nei linfociti T dei pazienti si accompagna a decrementati livelli di Crkl, e fosfo-Crkl con conseguente riduzione anche del fattore trascrizionale c-Fos, e della ciclina D3. Nonché ad una ridotta fosforilazione di stat5, dopo stimolo con IL-2. Il nostro dato suggerisce un ruolo potenziale, ancorché non unico, di Crkl e della sua aploinsufficienza nelle alterazioni funzionali dei linfociti Te in particolare nel deficit proliferativo, in pazienti affetti da del22q11.2.

### **Parole Chiave**

Crkl, sindrome di DiGeorge, fattore trascrizionale c-Fos, proliferazione, T Cell Receptor, interleuchina 2, stat5.

### **Introduzione al presente studio**

Crkl è una proteina adattatrice di 39 Kd che appartiene alla famiglia degli adattatori Crk. Essa è coinvolta nei processi di signaling di svariati fattori di crescita e citochine (1, 2).

Infatti essa svolge importanti funzioni in molti processi cellulari quali la migrazione cellulare, l'adesione e la risposta immune. La sua attivazione è mediata attraverso l'azione di vari fattori quali SDF-1 $\alpha$ , trombopoietina, gli interferoni di I° tipo e IL-2 (3-6). In particolare, gli interferoni di I° tipo, la trombopoietina e IL-2 stimolano Crkl a formare complessi con il fattore trascrizionale stat5. Questi complessi traslocano poi in sede nucleare ove si attaccano a sequenze consensus per attivare la trascrizione dell'informazione genetica (3-6) e in aggiunta, come proteina regolatoria, essa è anche in grado di modulare la capacità DNA legante di stat5 (7). Per di più, Crkl è altresì noto per il suo coinvolgimento nel processo apoptotico (8,9).

Recentemente, è stato chiaramente dimostrato come Crkl è over-espreso e gioca un importante ruolo nella proliferazione e crescita di svariati tumori (10,11). La down-regolazione di Crkl in questi tumori, induce l'uscita delle cellule dal ciclo cellulare decrementando il rateo proliferativo attraverso la modulazione negativa dei pathway coinvolgenti le cicline (12,13).

Nondimeno, in alcuni casi come nella Leucemia Mieloide Cronica (CML), i livelli di fosforilazione di Crkl vengono monitorati durante il trattamento con Imatinib poiché Crkl interagisce direttamente con il prodotto del cromosoma Philadelphia, bcr-abl che ne determina la iperfosforilazione (14-16).

Durante l'embriogenesi Crkl è espresso ubiquitariamente e ad alti livelli nella cresta neurale e nei suoi tessuti derivati quali la regione faringea, siti dai quali traggono origine l'aorta, il cuore, il timo, le paratiroidi e parte del volto (17). In effetti, mutazioni null a carico di Crkl, nei topi, mostrano un fenotipo simil DiGeorge, nel quale sono compresi difetti dei tessuti derivanti dalla cresta neurale quali tratto di efflusso del cuore, timo, paratiroidi, aorta e strutture craniofacciali (17,18).

Analogamente, sempre nei topi, mutazioni eterozigoti composte in Crkl/Tbx1 anche mostrano un fenotipo simil DiGeorge con una penetranza molto maggiore quando comparate alle mutazioni eterozigoti singole, in questi due geni (19).



## Introduzione

La sindrome di DiGeorge è causata da delezioni a carico del cromosoma 22 (del22q11). Nel 90% dei pazienti la regione deleta più tipica comprende il locus per il gene *Crkl* (17), sono delezioni estese di circa 3 MB. È importante sottolineare come il fenotipo dei diversi pazienti è molto variabile, e ciò anche all'interno dello stesso gruppo familiare o in soggetti con la delezione della medesima porzione di cromosoma.

Benchè le alterazioni a carico dell'aorta e del cuore siano abbastanza comprese nella loro origine (22), la manifestazioni a carico del sistema immune e la suscettibilità alle infezioni nei pazienti con sindrome di DiGeorge non sono ancora state pienamente comprese.

In questo studio, il nostro principale scopo era investigare se *Crkl* gioca un qualche ruolo nella sindrome di DiGeorge. In particolare, se la delezione in eterozigosi di *Crkl* può essere legata ad alcuni dei difetti funzionali dei linfociti T e allo sviluppo di infezioni di cui soffrono questi pazienti.

Così noi abbiamo analizzato l'impatto della delezione di *Crkl* sul triggering del TCR il quale modula la proliferazione attraverso la produzione di IL-2, il principale fattore proliferativo dei linfociti T. Le cellule dei pazienti con del22q11, e in particolare i linfociti T, mostrano infatti a volte un deficit proliferativo, ancorché parziale.

Quando stimulate con IL-2 in vitro, esse mostrano anche ridotti livelli di proteina e di *Crkl* e una riduzione di *Crkl* in forma fosforilata come comparato con i soggetti di controllo.

Ulteriormente, noi abbiamo analizzato le principali proteine regolatorie coinvolte nel ciclo cellulare, le cicline, le quali sono indotte dall'innescamento del TCR e conseguentemente dall'azione di IL-2. Le cicline D1, D2 e D3 sono espresse tramite *stat5* (23-26) e attraverso la via delle Map/Ras chinasi le quali vanno poi ad attivare il complesso trascrizionale AP-1 (27). Come descritto, *Crkl* è coinvolto nel pathway delle Map/Ras chinasi, il quale può essere attivato anche da fattori chemotattici che innescano il recettore CXCR4 (3) il quale svolge importanti funzioni durante lo sviluppo fetale e l'embriogenesi (28). Infatti le chinasi ERK1/2 sono delete in alcune forme inusuali di sindrome di DiGeorge, legate a microdelezioni non classiche (29).

L'espressione delle principali cicline, e di parte del complesso trascrizionale AP-1, in particolare di c-Fos, è normalmente up-regolata durante la proliferazione e questo avviene in risposta a vari fattori di crescita e alcune citochine (30-33). Qui, nei pazienti

## Introduzione

noi abbiamo mostrato una drastica riduzione dei livelli di c-Fos. In aggiuntar, c-Fos è anche conosciuto per giocare un ruolo importante nella modulazione dell'espressione della ciclina D1 (34,35). Comunque noi qui abbiamo osservato un decremento dei livelli della ciclina D3 ma non di quelli della ciclina D1.

Considerando che poiche Crkl e stat5 formano complessi trascrizionali che migrano in sede nucleare e di conseguenza modulano l'espressione genica (7). Noi, di conseguenza, abbiamo analizzato la fosforilazione di stat5, la quale appare essere ridotta nei linfociti T di pazienti stimolati con IL-2.

Noi abbiamo confermato I nostril risultati attraverso il silenziamento di Crkl in Jurkat T cell line, dimostrando che i diminuiti livelli di Crkl si associano con un decremento dei livelli di c-Fos assieme ad un difetto proliferativo, come nei linfociti T dei pazienti con del22q11.

A nostra conoscenza, questo studio rappresenta la prima evidenza sperimentale che suggerisca che Crkl, il quale è già stato associate al fenomeno proliferativo e alla regolazione del ciclo cellulare in altri contesti, possa essere coinvolto nella alterata proliferazione e nella ridotta espressione del fattore trascrizionale c-Fos, nella sindrome di DiGeorge.

## **Sindrome di DiGeorge (del22q11)**

### **Note Introduttive alla del22q11**

La sindrome di DiGeorge (OMIM 188400) è causata da un disturbo dell'embriogenesi della 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> tasca branchiale e della cresta neurale riferibile a delezioni più o meno estese a carico del braccio lungo del cromosoma 22 (22q11), Fig 1. Essa colpisce 1/4000, 1/6000 nati e la delezione può insorgere de novo o essere ereditata da uno dei due genitori con modalità autosomica dominante. L'esordio è neontatale con tetania, ipocalcemia e segni di cardiopatia congenita (interessati soprattutto l'arco aortico, le polmonari e i setti interventricolari; frequente anche la tetralogia di Fallot). Alla nascita spiccano anche i dismorfismi facciali (36).

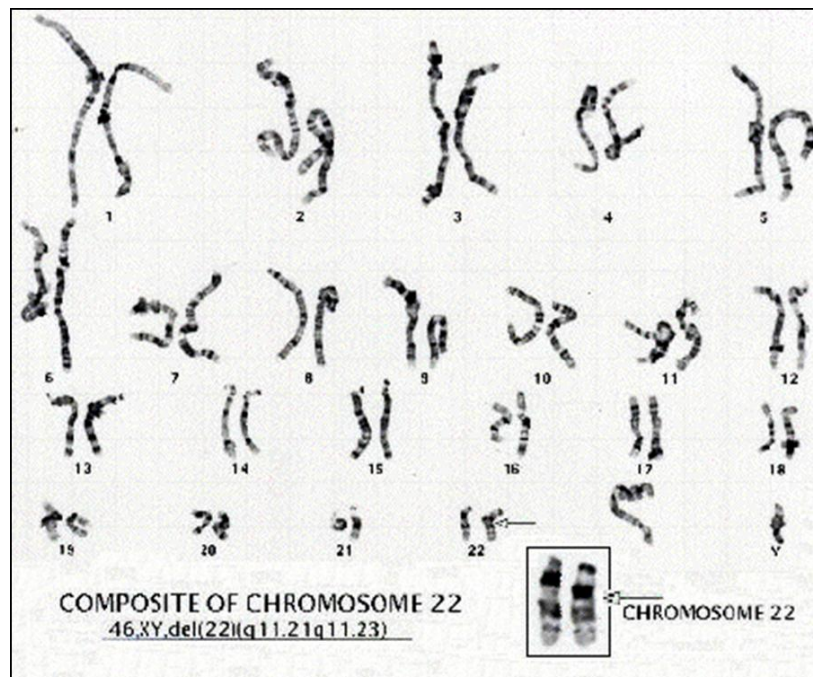
Tra le possibili malformazioni conseguenti alla microdelezione del cromosoma 22, l'ipoplasia o aplasia completa del timo modula la gravità del difetto immunologico, per

## Introduzione

cui vengono distinte forme complete (con compromissione marcata dell'immunità T) e forma parziali (nelle quali le alterazioni immunologiche sono modeste o assenti).

Esiste infatti una forma atipica della sindrome di DiGeorge: essa si caratterizza per espansione oligoclonale di linfociti T, con elevati livelli di IgE sieriche e caratteri comuni con la sindrome di Omenn (rash e linfadenopatia). Questo fenotipo è anche conosciuto come sindrome di DiGeorge completa atipica (37).

Essa venne descritta per la prima volta nel 1965 come Sindrome di DiGeorge (DGS) appunto nel 1965 (DiGeorge A). Venne poi descritta nuovamente nel 1976 come sindrome con anomalie del volto e tronco-conali (Conu-truncal anomaly face syndrome (CTAFS) 1976, Takao A). e di nuovo nel 1978 come sindrome velo-cardio-facciale (VCFS) 1978, Shprintzen R).



**Fig 1:** Rappresentazione di un cariotipo di un paziente DiGeorge che mostra la classica delezione, in eterozigosi, sul braccio lungo del cromosoma 22 (*del22q11*).

Come già detto l'incidenza è di circa 1/5000 nati vivi, con un 8 – 28% di delezioni che vengono ereditate per via autosomica dominante. Tuttavia la maggior parte delle delezioni sono “de novo”.

La maggioranza delle delezioni, circa 80 – 90% dei casi, è legato a delezioni di circa 3 MB (circa 30 geni), mentre il restante 10 – 20% è dovuto a microdelezioni aventi

## Introduzione

estensione di circa 1.5 MB non evidenziabili tramite FISH.

Caratteristica peculiare di questa sindrome è la mancanza di una correlazione tra estensione del tratto deletato e sintomatologia clinica, il che si accompagna anche ad una estrema variabilità del fenotipo clinico, sia inter che intra-familiare.

La delezione 22q11.2 causa un difetto nello sviluppo delle strutture che derivano dalla 3<sup>A</sup> e 4<sup>A</sup> tasca branchiale con conseguente ipoplasia/aplasia del Timo, che spiega la oligoclonalità dei linfociti T e l'immunodeficienza T, che ove marcata con grave riduzione dei linfociti T si può accompagnare anche a riduzione dei linfociti B e riduzione delle immunoglobuline di classe A.

Vi è poi ipoplasia/aplasia delle Paratiroidi, con conseguente ipocalcemia e conseguente tetania e convulsioni.

Ed anomalie del cuore e dell'aorta con anomalie troncoconali, interruzioni dell'arco aortico, atresia polmonare, difetto del setto interventricolare e anomalie dell'arco aortico, tetralogia di Fallot. Queste sono anche le conseguenze più serie e gravi di questa sindrome, che ne sono il principale fattore di morbilità e mortalità.

E per finire sono presenti anche anomalie del volto e dell'arco palatino, con una facies tipica: Bocca, rime palpebrali e padiglioni auricolari piccoli, palato ogivale, micrognazia.

Le anomalie Immunologiche sono molto ampie: da un normale profilo immunologico ad una completa assenza dei T:

- DGS COMPLETI (0.5 – 2 %) dei pazienti, con diminuzione molto accentuata dei linfociti e delle loro funzioni
- DGS PARZIALI (95 – 98 %) dei pazienti, con difetto immunologico lieve/moderato
- Immunodeficienza da deficit dei linfociti T. (oligoclonalità T)
- Eventuale deficit dei B e di IgA.

Queste comportano infezioni ricorrenti delle vie aeree alte (otiti, faringiti, sinusiti) e basse (bronchiti e broncopolmoniti) nel 60% dei casi.

Vi sono anche Infezioni virali ricorrenti (erpetiche, CMV, EBV), ma anche infezioni batteriche e/o opportunistiche.

## Introduzione

Le alterazioni immunologiche in pazienti DGS possono predisporre (15 - 25 % dei casi) allo sviluppo di patologie autoimmuni, fra le più frequenti vi sono:

Artrite Reumatoide, Porpora Trombocitopenica, Anemie Emolitiche Autoimmuni  
Pancitopenie, Diabete, Tireopatie, Vitiligine, Epatiti.

### **Caratteristiche specifiche della del22q11**

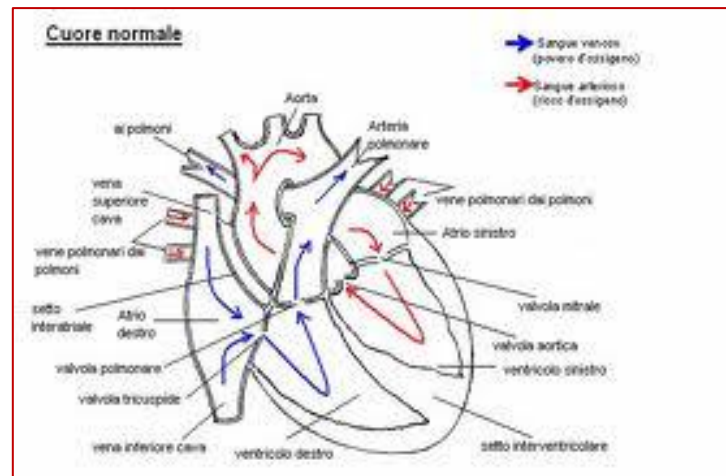
La Sindrome da delezione della regione cromosomica 22q11.2 rappresenta la più comune sindrome da microdelezione che si manifesta nella specie umana, con frequenza approssimativa di 1 ogni 4000 nati vivi (Tezenas du Montcel S. J Med Genet 1996). Recentemente, inoltre, si sta assistendo ad un progressivo aumento dell'incidenza dovuto all'identificazione di genitori di bambini affetti dalla sindrome del22 portatori anch'essi della delezione (McDonald-McGinn DM., Genet Med 2001). È presente in circa 1 su 68 bambini con cardiopatia congenita, ed è la più comune sindrome associata ad anomalie del palato ed ad insufficienza velofaringea, mentre rappresenta la seconda causa più comune di ritardo dello sviluppo psicomotorio (circa 2.4 % degli individui affetti) (Perez E., Curr Opin Ped 2002; Woodin M., Genet Med 2001).

### **Anomalie facciali**

I bambini con sindrome da delezione del cromosoma 22 presentano generalmente un viso allungato e stretto. (Perez E. Curr Opin Pediatr. 2002; Botto LD., Pediatrics 2003). Le dismorfie più frequentemente riscontrabili sono: ipertelorismo, rime palpebrali strette e dirette verso l'alto e l'esterno, pienezza periorbitale, naso prominente (con punta arrotondata e ipoplasia delle narici nel bambino più piccolo, "tubulare" con punta larga e ipoplasia delle narici nel bambino più grande), filtro corto, bocca piccola, tendenzialmente aperta, con labbro superiore estroverso (bocca "a carpa"), palato ogivale, micrognazia, padiglioni auricolari piccoli, con elice ripiegato e accartocciato. (DiGeorge AM. J Pediatr 1965;67:907-908)

### **Anomalie cardiache**

Le cardiopatie congenite sono una caratteristica frequente della sindrome essendo presenti in circa il 75% dei soggetti affetti e rappresentando nella maggior parte dei casi il sintomo che più frequentemente porta alla diagnosi. Sono le anomalie più gravi, infatti il 50% dei decessi è dovuto alla cardiopatia. La gravità clinica delle varie cardiopatie é inversamente proporzionale all'età di esordio dei vari sintomi Fig 2.



*Fig 2: Rappresentazione della struttura di un cuore sano.*

Le classiche cardiopatie che si riscontrano in questi pazienti sono difetti troncoconali che consistono in anomalie del tratto di efflusso del cuore. (Digilio MC.1997)

Le più frequenti sono:

- Interruzione dell'arco aortico tipo B
- Persistenza del tronco arterioso
- Tetralogia di Fallot
- Atresia polmonare con difetto del setto interventricolare
- Difetti del setto interventricolare
- Anomalie isolate dell'arco aortico

Le anomalie cardiache meno frequenti sono:

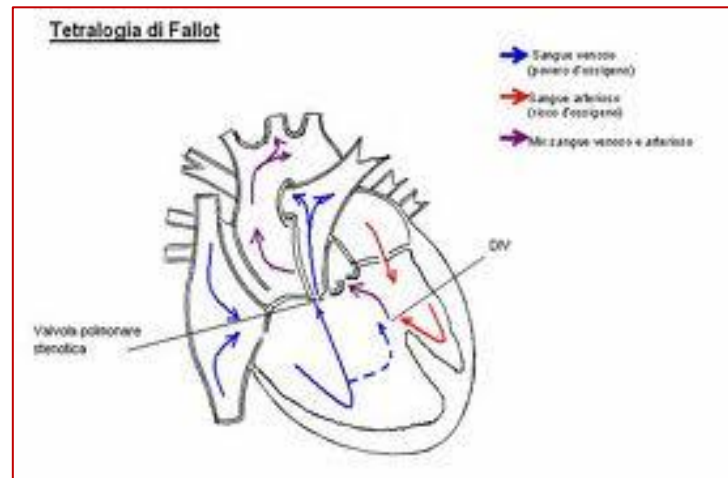
- Difetto interatriale
- Ventricolo destro a doppia uscita
- Coartazione aortica
- Trasposizione delle grandi arterie

Di frequente riscontro è anche la presenza di arco vortice destro con arteria succlavia aberrante. Nei bambini con del 22q11 e cardiopatia congenita troncoconale è stata riportata una prevalenza di fenotipi cardiaci specifici consistenti in anomalie cardiovascolari associate che di frequente caratterizzano il quadro della anatomia cardiaca, Fig 3.

Queste anomalie associate alle malformazioni troncoconali riguardano in particolare il setto infundibolare (che può essere ipoplasico o assente) le valvole semilunari (che

## Introduzione

possono essere stenotiche o insufficienti), l'arco aortico (che può essere destro, doppio o cervicale) e l'arteria succlavia (che può essere aberrante).



*Fig 3: Le alterazioni cardiache nei pazienti DiGeorge.*

### **Disturbi dell'alimentazione e anomalie gastrointestinali**

Le difficoltà alimentari costituiscono in genere, dopo i difetti cardiaci, il primo disturbo segnalato da parte dei genitori dei neonati affetti. I bambini infatti hanno tipicamente difficoltà a coordinare il riflesso di suzione/deglutizione/respiro, con conseguente lenta alimentazione ed episodi di rigurgito, indipendentemente dai difetti anatomici cardiaci e del palato. (Eicher PS. et al J Pediatr. 2000).

I disturbi più comuni sono:

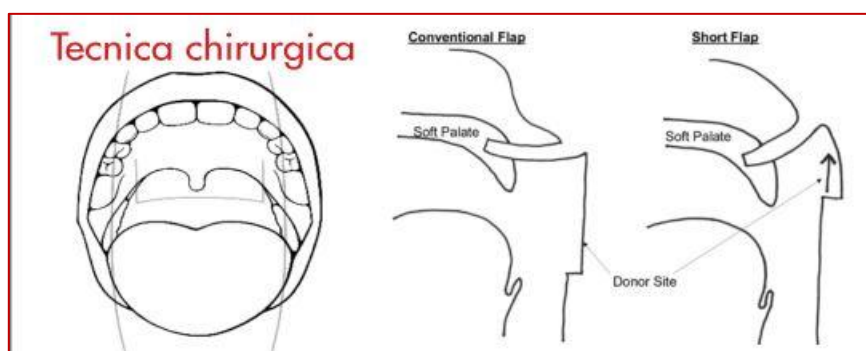
- il reflusso gastroesofageo
- le esofagiti
- costipazione cronica.
- Atresia esofagea,
- Ernia diaframmatica,
- Megacolon congenito
- Malformazioni anali (atresia, ano anteriorizzato)
- Anomalie dei denti, quali ritardo nella formazione ed eruzione della dentizione permanente e ipoplasia dello smalto.

### **Anomalie otorinolaringoiatriche**

Le anomalie anatomiche otorinolaringee sono comuni. Recenti studi hanno dimostrato che circa il 49% dei pazienti con del22 presenta anomalie otorinolaringee. L'insufficienza

## Introduzione

velo-faringea costituisce l'anomalia più frequente, Fig 4. Alcuni pazienti hanno una palatoschisi conclamata, altri una schisi della sottomucosa. La labioschisi è riscontrabile, ma meno frequentemente. Le alterazioni dell'udito sono frequenti (McDonald-McGinn DM.1999). Nei pazienti con del22 è descritta un' ipoacusia trasmissiva nel 40% dei casi. La maggior parte dei pazienti presenta anomalie del condotto uditivo che possono predisporre all'insorgenza di infezioni quali otiti dell'orecchio medio. Sordità neurosensoriale è segnalata nel 3 % dei casi. Comuni sono anche anomalie laringotracheali ed esofagee, laringomalacia, broncomalacia, stenosi o atresia delle coane e appendici o fistole preauricolari.



**Fig 4:** Rappresentazione della correzione chirurgica delle alterazioni palatine nei pazienti DiGeorge.

### **Anomalie neurologiche e neuropsicologiche**

Nei bambini con del22 possono essere presenti:

- ritardo nelle acquisizioni motorie
- ritardo del linguaggio
- difficoltà di apprendimento, con notevole variabilità dei sintomi e dell'età di esordio tra i pazienti

La prevalenza delle difficoltà di apprendimento risulta corrispondente all'82 – 100 % dei casi. Il quoziente intellettivo sembra variare tra il normale e il ritardo di sviluppo di entità moderata, con un QI medio di 70, mentre difetti di sviluppo di entità grave sono rari in questa sindrome. (Antshel KM.et al 2006; Basset AS.et al, Am J Psychiatry 2003).

Molti studi hanno riportato che alcuni bambini e adolescenti con del22 hanno una differenza tra QI verbale e QI di performance (si nota cioè un QI verbale maggiore rispetto al QI di performance), come segno di una disabilità cognitiva non-verbale. E' descritta inoltre una maggiore predisposizione alla lettura e alla scrittura rispetto alla matematica.



### **Anomalie psichiatriche**

Disturbi comportamentali presenti nei bambini sono:

- disturbo dell'attenzione
- iperattività
- instabilità emotiva
- ansia

Nei pazienti adulti é presente, talora, una tendenza a quadri psicotici simili alla schizofrenia.

### **Anomalie autoimmuni**

In questi pazienti sono stati riscontrati casi di porpora idiopatica trombocitopenica e di artrite reumatoide giovanile di tipo poliarticolare ad esordio precoce. La prevalenza di artrite reumatoide giovanile in bambini con DGS è significativamente più elevata rispetto alla popolazione generale. Sono stati descritti anche casi di anemia emolitica e pancitopenia autoimmune, diabete, tireopatia autoimmune o Morbo di Graves, epatite granulomatosa di probabile origine autoimmunitaria e vitiligine. (Gennery AR. et al, Arch Dis Child 2002).

La diversa espressione del fenotipo clinico associato alla delezione del cromosoma 22 che comprende casi oligo/asintomatici potrebbe condurre ad una sottostima delle manifestazioni autoimmuni.

### **Anomalie endocrine**

L'ipocalcemia neonatale dovuta ad ipoparatiroidismo come conseguenza del mancato o parziale sviluppo delle paratiroidi rappresenta uno degli aspetti frequenti della sindrome, essendo presente in circa il 60 - 70 % dei casi (McDonald-McGinn DM. Genet Couns.1999). La sintomatologia compare sovente in epoca neonatale dove può essere responsabile di crisi convulsive.

In genere l'ipocalcemia tende a correggersi in seguito all'ipertrofia paratiroidea compensatoria. É stata descritta anche una forma di ipoparatiroidismo latente, che evolve in ipoparatiroidismo ipocalcemico in età adolescenziale o più tardiva. Questi pazienti possono sviluppare un'ipocalcemia transitoria o permanente se si trovano in situazioni di stress, come interventi chirurgici o infezioni gravi. I dolori addominali possono essere il sintomo di un'ipocalcemia.

### Alterazioni immunologiche

Tra i pazienti affetti da del22, la forma clinica caratterizzata da fenotipo DiGeorge, è quella che con maggiore frequenza si associa alle alterazioni immunologiche. Il difetto immunologico osservato nei pazienti con Sindrome di diGeorge riguarda in modo particolare la componente dei linfociti T.

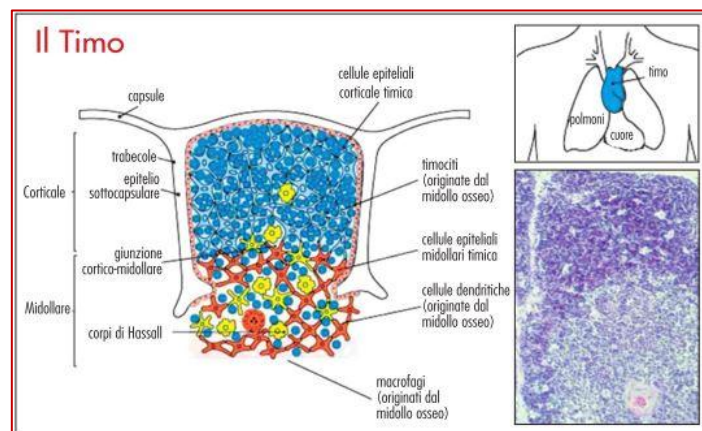
A seconda della gravità del difetto immunologico i pazienti possono essere suddivisi in due gruppi (Lisa J Kobrynski et al. Lancet 2007):

- pazienti con difetto immunologico parziale (pSDG)
- pazienti con difetto immunologico completo (cSDG)

La forma cSDG è rara (0,5 - 1,5 %) e presenta un quadro di immunodeficienza grave combinata, caratterizzato da linfopenia marcata, da importante riduzione fino alla quasi assenza dei linfociti T, per difettiva produzione delle cellule T da parte del timo Fig 5, da proliferazione linfocitaria fortemente ridotta, mentre i linfociti B sono in genere presenti.

La diagnosi differenziale con altre forme di SCID T-B+ può essere difficile da porre in assenza di sintomi precoci di tetania ipocalcémica o di alterazioni cardiache. Il riscontro di del22 è dirimente.

Il difetto immunologico nella pSDG è al contrario in genere modesto: il numero di cellule T è lievemente diminuito e la risposta proliferativa ai mitogeni/antigeni è in genere normale o quasi normale; spesso si assiste ad una normalizzazione di questi parametri nel tempo. Da qui la necessità di monitorare questi parametri con una periodicità differente a seconda dell'età in cui la diagnosi è stata posta. Si ritiene che la risposta ai mitogeni più che la conta dei linfociti T consenta di meglio definire la gravità del difetto immunologico.



**Fig 5:** Struttura del timo e sua localizzazione.

Sebbene la distinzione tra cSDG e pSDG sia attualmente considerata imprecisa nel senso che queste forme rappresentano solo i due estremi di un “continuum immunologico”, tuttavia il termine di cSDG continua ad essere utilizzato per indicare quei pazienti con un difetto immunologico particolarmente grave.

Studi immunologici più recenti, miranti a valutare il repertorio dei linfociti T con tecniche avanzate (spectratyping) hanno evidenziato significative alterazioni nel repertorio del TCR, principalmente limitato alla sottopopolazione CD8+. Se questo risultato sia la conseguenza della selezione di alcuni cloni dovute agli episodi infettivi o sia dovuta ad un difetto primitivo del timo, non è al momento noto. Recenti studi hanno dimostrato una diminuita percentuale di cellule CD4+CD25+ nei soggetti con SDG. Questa popolazione linfocitaria sembra giocare un ruolo importante nell'induzione della tolleranza immunologica e quindi nella prevenzione dell'autoimmunità.

Variabili alterazioni anche dell'immunità umorale, come un difetto isolato di IgA, una ipogammaglobulinemia, un difetto nella risposta anticorpale contro antigeni proteici o polisaccaridici, un difetto nelle sottoclassi delle IgG, sono stati riportati nella SDG. Se il difetto dell'immunità umorale sia secondario ad un difetto dei linfociti T o possa riconoscere come causa un difetto primitivo dei linfociti B è tuttora poco chiaro.

Le alterazioni immunologiche riportate rendono ragione della maggiore suscettibilità alle infezioni osservate nei pazienti con SDG. Al momento attuale poco si conosce sul quadro immunologico dei pazienti con delezione del 22 ma con un fenotipo clinico più compatibile con VCFS o CFTAS.

### **Altre caratteristiche**

Nei bambini con del22q11.2 si riscontra:

- basso peso alla nascita
- dita lunghe e sottili

Caratteristiche più rare della delezione sono:

- malformazioni renali (idronefrosi, agenesia renale unilaterale, cisti)
- anomalie genitourinarie (ipospadia, criptorchidismo, ernie ombelicali e inguinali, agenesia uterina)
- malformazioni delle estremità (piede torto, aplasia del radio, sindattilia, ipoplasia delle unghie)



## Introduzione

La funzione di questi adattatori è di fare da ponte fra varie proteine. Questa interazione può avvenire sia attraverso il dominio SH2 che si lega a residui di fosfo-tirosine, oppure tramite il dominio SH3 che con le sue regioni idrofobiche interagisce con sequenze ricche in prolina.

Crkl è coinvolta nel signaling di molte citochine e fattori di crescita.

Infatti essa è attivata da SDF-1 $\alpha$ , trombopoietina, interferono di I° tipo, IL-2 e GM-CSF. Gli interferoni di I° tipo, la trombopoietina e IL-2 stimolano Crkl a formare complessi con stat5, un importante fattore trascrizionale attivo nella proliferazione mediata da citochine quali IL-2 e GM-CSF. Questi complessi traslocano in sede nucleare e qui si legano a sequenze consensus avviando la trascrizione dell'informazione genetica. Infatti Crkl è noto per svolgere attività modulatoria in molti processi biologici quali la migrazione cellulare, l'adesione, l'apoptosi, la proliferazione e la risposta immune.

# OBIETTIVI

*In più o in meno poco importa .... L'importante è che ci sia qualche differenza !*

R. B.

Obiettivi

## **Obiettivi dello studio**

### **Scopo del lavoro**

Lo scopo del presente studio è stato quello di indagare l'impatto della aplo-insufficienza di Crkl su eventuali deficit funzionali a carico dei linfociti T in pazienti affetti da sindrome di DiGeorge.

Come già ricordato nell'introduzione in modelli murini con mutazioni null a carico di Crkl si evidenzia un fenotipo del tutto analogo a quello presentato dai pazienti affetti da del22q11.

Questo gene è uno di quelli normalmente presente fra i geni deleti nei pazienti affetti da sindrome di DiGeorge. Poiché esso è un adattatore che interagisce con molteplici altre proteine nella via di trasduzione del segnale di svariati fattori di crescita e citochine (dall'IL-2 all'SDF1- $\alpha$ , eritropoietina, GM-CSF, innesco del TCR ecc.) e poiché è noto che in fenomeni come l'adesione, l'apoptosi e la proliferazione Crkl è normalmente coinvolto. Considerato che Crkl è spesso over-espresso o iperattivo in molti svariati tipi di tumore e data la moltitudine di fenomeni biologici in cui è coinvolto esso appariva un potenziale candidato quale causa per spiegare alcuni degli aspetti patogenetici riscontrabili in questa sindrome.

In particolare il nostro interesse si è concentrato sui fenomeni biologici a carico dei Linfociti T. Dato che la base patogenetica delle infezioni, che spesso si osservano in pazienti affetti da del22q11, così come dei fenomeni di autoimmunità anch'essi spesso presenti in questi individui, è ancora assai poco compresa nelle sue basi fisiologiche e molecolari.

# MATERIALI E METODI

*Possiamo scegliere gli esperimenti, non i risultati !*

*R. B.*



## **Materiale e Metodi**

### **Pazienti**

Quattro pazienti rappresentativi di sindrome di DiGeorge, e quattro controlli sani sono stati arruolati per il presente studio. Tre erano pazienti di età pediatrica (PT1, PT2, PT3) e uno di era un paziente di età adulta (PT4). I soggetti di controllo erano matched per sesso ed età con i pazienti.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico e ogni partecipante allo studio ha dato il suo consenso informato.

### **Colture cellulari**

#### **Generazione di Blasti T (PHA-T cells)**

Campioni di sangue sono stati raccolti da quattro pazienti rappresentativi di disindrome di DiGeorge e da quattro controlli sani, matched per sesso ed età. Il prelievo è stato fatto in provette BD Vacutainer Plus plastic whole blood tubes (BD Bioscience, San Jose, Calif).

Cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs) sono state ottenute per centrifugazione in gradiente di densità su Ficoll-HyPaque Lympholyte (Cederlane, Canada), secondo la seguente procedura:

- Al sangue è stato aggiunto un uguale volume di soluzione fisiologica, quindi dopo aver mescolato bene, si stratifica il tutto in una nuova Falcon contenete un volume di Lympholyte pari a quello iniziale del campione di sangue, evitando di mescolare i due fluidi.
- Si centrifuga 20 minuti a 2000 rpm, a temperatura ambiente, si aspira quindi l'anello di PBMC con una pipetta pasteur.
- Si seguono due lavaggi con PBS 1 X prima a 800 rpm per 10 minuti e poi un secondo lavaggio a 1400 rpm per 5 minuti, si esegue poi la conta dei PBMCs, in camera di Burkner.

Blasti PHA-T sono stati generati dai PBMCs dopo stimolazione con PHA 5 µg/ml

(Sigma Aldrich, St Louis, Mo) e IL-2 600 U/ml (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Le cellule, sono state piastrate alla densità di  $5 \times 10^5$  cell/ml in piastre da 96 well (round bottom) e mantenute in coltura con RPMI supplementato con 60mg/L di penicillina (Euroclone, Italy), 12.5 mg/L di streptomina (Euroclone, Italy), e di 2mmol/L di L-glutamine (Euroclone, Italy) e 10% siero fetale bovino (FCS) (Euroclone, Italy). E alle concentrazioni su menzionate di IL-2 e PHA per 5-6 giorni, il tempo necessario a far partire i blasti T.

Successivamente le cellule venivano espanse e mantenute tramite splittamento 1 a 2 ogni 3-4 giorni con RPMI completo contenete IL-2 1200U/ml.

I blasti PHA-T erano usati per vari esperimenti, dopo due/tre settimane dalla loro coltura e d espansione.

Per verificare la fosforilazione di Crkl i blasti PHA-T di pazienti e controlli sono stati prelevati e starvati in falcon da 6 well e terreno completo, senza stimoli per 24 ore. Dopodiché le cellule erano stimulate con IL-2 200 U/ml, o SDF-1 $\alpha$  o in semplice medium per 10 e 5 minuti rispettivamente.

Mentre per verificare la modulazione delle cicline e di c-Fos i blasti PHA-T sono stati trattati come sopra, ma stimolati per 18 ore con IL-2 200 U/ml, o con  $\alpha$ CD3 5  $\mu$ g/ml pre-coated (nelle celle) e anticorpo  $\alpha$ CD28 750 ng/ml. Mentre per la fosforilazione di stat5 ancora trattati come sopra ma stimolati con IL-2 o per innesco del TCR per 10 minuti, alle stesse concentrazioni sopra menzionate.

### **Coltura di cellule Jurkat (Jurkat T cell lines)**

Le cellule Jurkat erano invece mantenute in medium fresco di coltura (RPMI completo al 10% di FCS supplementato come sopra) in T 25 flask. Periodicamente, al viraggio del terreno di coltura, o ogni 2-4 giorni le cellule erano splittate 1 a 2 con RPMI completo fresco.

E impiegate 48 ore dopo la transfezione con siRNA specifico per Crkl.

### **Coltura di Linfociti T CD4+**

Per ottenere una coltura di linfociti CD4+ (Linfociti T Helper totali), è necessario isolare i linfociti T CD4 positivi dai PBMCs, e successivamente ricavarli da essi. Per

far ciò abbiamo utilizzato il kit CD4 MicroBeads, human (Miltenyi biotech) secondo il seguente protocollo, che rappresenta un metodo di selezione positiva:

- Determinare il numero di cellule e centrifugare la sospensione cellulare a 1200 rpm per 10 minuti, dopo aver aggiunto 2 ml di MACS buffer (PBS, 0.5% FCS, 2 mM EDTA). Aspirare completamente il surnatante e risospendere il pellet cellulare in 80  $\mu$ l per  $10^7$  cellule di buffer (PBS 0.5% FCS, 2 mM EDTA).
- Aggiungere 20  $\mu$ l di biglie CD4 per  $10^7$  cellule, miscelare bene e incubare per 15 minuti in frigo 2-8°.
- Lavare le cellule aggiungendo 1-2 ml di buffer (PBS 0.5% FCS, 2 mM EDTA) per  $10^7$  cellule e centrifugare a 1200 giri per 10 minuti e aspirare completamente il surnatante.

Aggiungere 500  $\mu$ l di buffer, quindi procedere alla separazione magnetica con colonne MS ( $2 \times 10^8$ ).

- Posizionare la colonna su supporto magnetico, con sotto una provetta falcon da 15 ml.
- Preparare la colonna reidratandola con 500  $\mu$ l di buffer.
- Applicare quindi la sospensione cellulare all'interno della colonna, raccogliere le cellule che sono passate attraverso la colonna, che rappresentano la frazione non legata alle biglie (CD4-).
- Effettuare il lavaggio per 3 volte aggiungendo 500  $\mu$ l di buffer (volume finale falcon 2 ml).
- Togliere la colonna dal separatore magnetico e metterla in una nuova falcon da 15 ml.
- Aggiungere 1 ml di terreno completo nella colonna, applicare il relativo stantuffo: le cellule legate alle biglie (CD4+) fluiranno nella provetta.

Le cellule sono poi state lavate e risospese in RPMI completo e coltivate sotto gli stimoli di anticorpo  $\alpha$ CD3 5  $\mu$ g/ml pre-coated nelle celle e anticorpo  $\alpha$ CD28 750 ng/ml, oppure con IL-2 200 U/ml, o in semplice medium, con un time course di 2, 24 e 96 ore per verificare la modulazione della proteina totale e dell'mRNA di Crkl.

### **Analisi Citometrica**

Metodiche di citometria a flusso sono state impiegate per le successive analisi.

Saggio proliferativo: è stato condotto su PBMCs marcati con Carbossifluoresceina succinimidil-estere (CFSE). Secondo questo protocollo:

- In breve,  $1 \times 10^6$  cellule sono sospese in 1 ml di terreno RPMI completo al 5% di FCS in una provetta falcon da 15 ml, la provetta veniva adagiata lentamente e all'estremità opposta al fondo veniva pipettati 110  $\mu$ l di PBS, a cui erano aggiunti 1,1  $\mu$ l di soluzione stok di CFSE 5 mM (Sigma Aldrich, St Louis, Mo).
- La provetta era poi chiusa e rapidamente capovolta e vortexata per 5 secondi, poi ricoperta di stagnola e incubata al buio per 5 minuti, le cellule venivano così marcate con CFSE 25  $\mu$ M.
- Le cellule erano poi lavate mediante aggiunta di 10 ml di PBS al 5% di FCS e lavate a 1200 rpm per 10 minuti, ripetendo il lavaggio una seconda volta.
- Dopo lavaggio con PBS le cellule vengono risospese in RPMI completo e sedimentate in piastra falcon da 24 well alla densità di  $5 \times 10^5$  cell/ml in presenza o assenza di PHA 5  $\mu$ g/ml (Sigma) o di anticorpo  $\alpha$ CD3 5  $\mu$ g/ml (BD Bioscience) precottato sulle celle, più anticorpo  $\alpha$ CD28 750 ng/ml (BD Bioscience).

Dopo 72 ore le cellule sono state raccolte, lavate in PBS per due volte e dopo marcatura con anticorpo anti CD3/PerCP (BD Bioscience) acquisite con citofluorimetro Facs Calibur.

Saggio di apoptosi:  $5 \times 10^5$  cellule/ml di PBMCs erano sedimentati in piastra falcon da 24 well e indotte all'apoptosi nelle seguenti condizioni: medium con FBS, come riferimento, e medium senza siero, in aggiunta è stata testata anche le seguenti condizioni, medium completo con LPS 200ng/ml (PeproTech) o medium addizionati di anticorpo  $\alpha$ CD3 5  $\mu$ g/ml pre-coated nelle celle e anticorpo  $\alpha$ CD28 750 ng/ml. Dopo 96 ore le cellule erano raccolte e marcate con Annexin V e ioduro di propidio PI (Dead Cell Apoptosis Kit, Invitrogen, Oregon, USA) e acquisite al citometro, secondo il seguente protocollo:

## Materiali e Metodi

- Si prepara anzitutto del buffer annexin 1 X, diluendo la madre di buffer annexin che è un 5 X in acqua.
- Si centrifugano i PBMCs raccolti, dopo cultura per 4 giorni, e si lavano in 2-3 ml di buffer 1 X, centrifugando per 5 minuti a 1200 rpm, in provetta falcon da 15 ml.
- Si butta il surnatante e si aggiungono 100 µl di buffer annexin 1 X, dopo aver risospeso le cellule, e si aggiungono 5 µl di Annexin V/alexa fluor 488, dallo stok distribuito nel kit.
- Si aggiunge anche 1 µl di PI (il PI non si usa tal quale si diluiscono 5 µl di soluzione stok di PI in 45 µl di annexin buffer 1 X e da questa si preleva il PI per la marcatura).
- Si incuba 15 minuti a temperatura ambiente al buio.
- Dopo di chè non si lava, si aggiungono 300-400 µl di buffer annexin 1 X si risospende e si acquisisce al citofluorimetro.

Analisi di Markers di attivazione cellulare: Per questo scopo, 100µl di sangue intero di pazienti e soggetti di controllo erano stimolati, o meno, con IL-2 100 U/ml, anticorpo  $\alpha$ CD3 5 µg/ml in fase solubile (BD Bioscience) e anticorpo  $\alpha$ CD28 750ng/ml (BD Bioscience) per 2, 4 e 24 ore. Le cellule erano poi lavate in PBS e marcate con anticorpi  $\alpha$ CD4/PerCP-Cy5,  $\alpha$ CD25/PE e  $\alpha$ CD69/FITC (BD Bioscience). Mentre per l'espressione di CD62L è stata valutata su sangue intero con una marcatura diretta con anticorpi  $\alpha$ CD45RO/FITC,  $\alpha$ CD4/PerCP-Cy5 e  $\alpha$ CD62L/PE-Cy5(BD Bioscience).

In breve si è operato come segue:

- Dopo stimolazione, fatta per comodità in tubini da FACS, o direttamente su sangue non stimolato (per i T0 e per la marcatura del CD62L), i campioni venivano lavati in 3 ml di PBS a 1400 rpm per 5 minuti, e si buttava il surnatante
- Fatto questo sui circa 100 µl di sangue rimasto si aggiungevano 5 µl dei relativi anticorpi sopra menzionati, e si incubava il tutto per 15 minuti a temperatura ambiente, al buio.
- Dopodichè si aggiungono 2 ml di BD facs lysing solution 1 X (la madre è una

soluzione 10 X che va diluita in acqua). Si risospende e si vortexa qualche secondo e si incuba per 15 minuti al buio a temperatura ambiente.

- Infine si lava con PBS a 1400 rpm per 5 minuti, per almeno due volte, dopodiché si risospende il tutto in 300-400  $\mu$ l di PBS e si acquisisce al citofluorimetro.

Tutti I dati acquisiti con il citofluorimetro sono stati analizzati con FlowJo software 7.5.

### **Western blot**

L'analisi per l'espressione della proteina di Crkl, e di ERK1/2, stat5, stat3, c-Fos, cicline D1, D2, D3 sono state condotte su blasti PHA-T, coltivati per tre settimane prima di essere usati per gli esperimenti, sia da pazienti che da soggetti di controllo.

- In breve,  $2 \times 10^6$  erano deprivate di IL-2 per 24 ore e poi stimolate, o meno, con SDF-1 $\alpha$  300 ng/ml (PeproTech) o IL-2 200 U/ml (PeproTech) o con  $\alpha$ CD3 5 $\mu$ g/ml e  $\alpha$ CD28 750 ng/ml per 5, 10 o 15 minuti per una analisi della fosforilazione per tempi brevi e per 2, 24 e 96 ore la analisi della modulazione della proteina per lungo tempo. Le cellule erano raccolte in PBS freddo, lavate sempre in PBS freddo e lisate in RIPA Lysis buffer (Euroclone) supplementato con sodio ortovanadato 20mM, EDTA 0.5 M e inibitori delle fosfatasi e delle proteasi (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific).
- Dopo quantificazione con il metodo Bradford, 30 $\mu$ g di estratto proteico totale è stato caricato su gel NuPage 10% Bis-Tris da 1.5 mm Gel (Invitrogen) e fatto migrare per 2 ore a 80 volt in NuPage MES SDS Running Buffer (Invitrogen).
- Successivamente le proteine sono state trasferite su Immobilon-P Transfer Membrane PVDF (Millipore) per 1 ora a 350mA in NuPage Transfer Buffer (Invitrogen).
- Successivamente a questo, le membrane erano incubate per 2 ore con i relative anticorpi primari: anti Crkl, stat3, stat5, p42/44 MAPK, c-Fos, ciclina

D1, ciclina D2, ciclina D3 o incubate per 24 ore con gli anticorpi anti p-Crkl (pY207), p-stat5 (pY694), p-stat3 (pY705), p-ERK1/2 (pT202/Y204) (Cell Signaling, Danvers, Mass) o con anticorpi anti  $\alpha$ -tubulin e actina (Sigma-Aldrich) quali proteine housekeeping di controllo.

- Le membrane, dopo lavaggio in TBS-Tween al 2%, venivano incubate con anticorpi secondari: goat anti-rabbit IgG-HRP o goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology) per 1 ora e sviluppate, dopo lsvaggio, con LiteAblot Extend ECL (EuroClone) e l'immagine acquisita con Biospectrum AC Imaging System (UVP).

L'analisi computazionale, semiquantitativa, per le immagini acquisite in western blot è stata effettuata con Gel-Pro Analyzer 4 software.

### **Analisi in Real-time (RT-PCR)**

L'espressione di mRNA di Crkl è stata eseguita su blasti PHA-T o su linee Jurkat transfettate con siRNA Crkl specifico. In breve,  $3 \times 10^5$  cellule per cella erano coltivate e stimulate o meno con anticorpo  $\alpha$ CD3 5 $\mu$ g/ml assieme ad anticorpo  $\alpha$ CD28 750ng/ml o IL-2 200U/ml o SDF-1 $\alpha$  300ng/ml per 2, 24 o 96 ore, dopodiché l'RNA è stato estratto con RNA mini Kit (Qiagen) e la retro-trascrizione dell'RNA totale è stata eseguita con il kit High Capacity Retro transcription Kit (Applied Biosystems). La analisi in real time è stata fatta con sonde Crkl specifica, sonda per PIM-1 e CD25, oltre che con sonde per beta-actin e GAPDH quali geni housekeeping (Applied Biosystems) e l'analisi è stata condotta su piattaforme CFX96 Real-Time System (BIO-RAD).

In specifico si è operato come segue:

#### Estrazione dell'RNA:

- le  $3 \times 10^5$  cellule trattate come sopra venivano raccolte e lavate in PBS a 800 rpm per 10 minuti a freddo, buttato il surnatante si aggiungevano alle cellule 350  $\mu$ l di buffer RTL (buffer di lisi addizionato di beta-mercapto etanolo, 1  $\mu$ l per ogni 1 ml di buffer RTL). Con una siringa ipodermica si spipetta 5-6 volte la sospensione per favorire la rottura delle cellule.
- Si addizionano 350  $\mu$ l di etanolo al 70% e si spipetta bene la sospensione, si

## Materiali e Metodi

trasferisce il tutto su di una colonnina e si centrifuga a 12.000 rpm per 30 secondi, si butta il residuo.

- Si aggiungono 350  $\mu$ l di buffer RW1 e si centrifuga a 12.000 rpm per 30 secondi, si butta il residuo e si incuba con DNAsi per degradare il DNA genomico residuo. (per ogni punto si miscelano 10  $\mu$ l di DNAsi 1 stock solution e 70  $\mu$ l di buffer RDD, si miscela per inversione). Si distribuiscono 80  $\mu$ l di questa mix di DNAsi 1 su ogni colonnina e si lascia agire 15 minuti a temperatura ambiente.
- Dopodiché si addiziona 350  $\mu$ l di buffer RW1 e si centrifuga a 12.000 rpm per 30 secondi.
- Si butta il residuo e si addizionano 500  $\mu$ l di buffer RPE e si centrifuga a 12.000 rpm per 30 secondi, si scarica il contenuto.
- Si si addizionano 500  $\mu$ l di buffer RPE e si ricentrifuga a 12.000 rpm per 2 minuti, si butta il tubino (tenendo la colonnina).
- Si trasferisce in un tubino nuovo e si centrifuga a 14.000 rpm per 1 minuto. Si trasferisce poi la colonnina in un'ependorf da 1,5 ml siglata si aggiungono 55  $\mu$ l di RNAsi-Free-Water e si centrifuga a 12.000 rpm per 1 minuto.

Recuperato l'RNA si tiene su ghiaccio e si quantifica.

### Retrotrascrizione:

La retrotrascrizione dell RNA appena estratto è stata condotta con il kit High Capacity Retro transcription Kit (Applied Biosystems) in pratica si fa una mix seguendo il seguente schema (per 1 reazione):

- 10 X Reverse transcription buffer (10  $\mu$ l)
- 25 X DNTPs (4  $\mu$ l)
- 10 X Random Primers (10  $\mu$ l)
- Multiscribe reverse transcriptase 50 U/ $\mu$ l (5  $\mu$ l)
- Nuclease free-water (19  $\mu$ l)
- RNAsi inhibitor (2  $\mu$ l)

Fa un volume finale di 50  $\mu$ l a cui si addizionano i 50  $\mu$ l di estratto di RNA si divide in due tubini da 0,2 e si retrotrascrive secondo il seguente protocollo:



## Materiali e Metodi

- 25°C per 10 minuti
- 37°C per 120 minuti
- 4°C a infinito

Si toglie e il cDNA è usabile per la real time

### Mix per Real time

Per ogni sonda (assay) di real time si fa una mix che avrà un volume finale di 20 µl, ogni condizione si testa in triplicato. E si carica poi sulla piastra da real time da 96 pozzetti.

La mix è così composta (per una reazione):

- Master Mix (Taq-Man gene expression master Mix ) (10 µl)
- Assay (sonda) (1 µl)
- Acqua (4 µl)
- cDNA (5 µl)

si distribuisce nella piastra, si fa il tutto in triplicato, e si mettono anche gli NTC che sono fatti come sopra ma con acqua al posto del cDNA. Si copre la piastra con la apposita pellicola, la si centrifuga per far cadere tutto sul fondo e la si carica sulla macchina da Real time.

Con il seguente programma:

- 50°C per 30 secondi
- 95°C per 10 minuti
- 95°C per 15 secondi
- 58°C per 1 minuto

Tutto per 44 cicli

### **Silenziamento con siRNA specifico per Crkl**

Cellule Jurkat sono state usate per la transfezione di un siRNA Crkl specifico in modo da silenziare specificatamente il gene Crkl per successivamente condurre alcuni saggi funzionali, ciò per stabilire se i fenomeni osservati su blasti T di pazienti erano legati alla aplo-insufficienza di Crkl o ad altre cause. Considerando anche il fatto che nella sindrome di DiGeorge sono mediamente deleti circa una trentina di

geni.

In parallelo è stato impiegato, come controllo, anche un siRNA Non Target (Applied Biosystems), e la transfezione è stata condotta con elettroporatore Amaxa 4D Nucleofector Systems (Lonza, Cologne AG, Germany) secondo le indicazioni del produttore. In breve,  $1 \times 10^6$  sono state impiegate per transfettare 150 o 300 nM di siRNA di Crkl (ambion, Life technologies) o 300 nM di siRNA Non Target. Dopodiché una analisi di Real-Time, di Immunoblots e di proliferazione sono state eseguite su queste cellule, 72 ore dopo la transfezione. In specifico il protocollo seguito è stato il seguente:

- Si prepara la soluzione per la nucleofezione (che cambia a seconda del tipo di cellula impiegata, nel nostro caso abbiamo usato il kit SE Cell Line 4D-Nucleofector (Lonza). Per ogni singola condizione si prelevano e si mettono in una eppendorf da 1,5 ml 82  $\mu$ l di SE nucleofector solution a cui si aggiungono 18  $\mu$ l di Supplement e si pipetta delicatamente.
- A questa mix si aggiunge il siRNA per la transfezione. Noi abbiamo aggiunto 1,5  $\mu$ l di stok solution siRNA (che aveva una concentrazione iniziale di 20  $\mu$ M.) Così abbiamo ottenuto una concentrazione finale di 300 nM di siRNA. Ovviamente ne abbiamo aggiunto 0,75  $\mu$ l per la condizione a 150 nM.
- Si prelevano le cellule a una densità di  $1 \times 10^6$  cellule per punto, in una provetta falcon da 15 ml. Si risospendono le cellule in 10 ml di RPMI completo, caldo, supplementato di HEPES 10mM. E si centrifugano a 1200 rpm per 6 minuti.
- Si aspira il surnatante, e si aggiungono 100  $\mu$ l della mix fatta sopra spipettando delicatamente, e risospendendo le cellule.
- Si prelevano tutto e si pone la mix con le cellule nella Single-Nucleocuvette da 100  $\mu$ l fornita nel kit, facendo attenzione a non generare bolle.
- Si caricano le Nucleocuvette nell'elettroporatore e si fa partire l'apposito programma di Nucleofezione presente nell'elettroporatore Amaxa.
- Si tolgono le nucleocuvette e si lasciano riposare per almeno 5-10 minuti sotto cappa, dopodiché si aggiungono alle cuvette 500  $\mu$ l di RPMI caldo, completo con HEPES 10 mM. Si pipetta delicatamente e poche volte, e si preleva il tutto trasferendo in una piastra da 12 well, in pozzetti che già

## Materiali e Metodi

contengano 500 µl di terreno RPMI completo.

- Dopo 3-4 ore si possono aggiungere altri 500 µl a punto di terreno completo.

La sequenza dei siRNA specifici per il silenziamento di Crkl era la seguente:

Sequenza 5' > 3' siRNA SENSE, GGUGAGAUCUAGUGAUAAtt

Sequenza 5' > 3' siRNA ANTISENSE, UUAUCACUAGGAUCUCACCct

### **Analisi statistica**

Tutti gli esperimenti sono stati fatti in triplicato e l'analisi statistica è stata effettuata impiegando il T test di Student. Con un p-value inferior a 0.05 che è stato considerato essere statisticamente significativo.

## RISULTATI

*Se descrivi un fenomeno biologico, postulando l'influenza di un fattore sconosciuto, tieni sempre a mente che ti verrà chiesto .... quale è quel fattore !*

R. B.

**Risultati****Pazienti**

Per lo studio sono stati presi in considerazione quattro pazienti, di cui tre in età pediatrica e uno in età adulta (pt 4), seguiti ambulatorialmente con controlli periodici nel *follow up* per la malattia di base, Tab 1.

<b>Tab 1</b>	<b>PT 1</b>	<b>PT 2</b>	<b>PT 3</b>	<b>PT 4</b>
<b>Età</b>	4	5	5	46
<b>Sesso</b>	M	F	M	M
<b>Età alla diagnosi</b>	Alla nascita	Alla nascita	Alla nascita	Età adulta
<b>Malformazioni nel tratto di eflusso del cuore (Y/N)</b>	Y	Y	Y	N
<b>Difetti Vascolari (Y/N)</b>	N	N	N	N
<b>Difetti craniofacciali (Y/N)</b>	Y	Y	Y	Y
<b>Anormalità scheletriche (Y/N)</b>	Y	Y	Y	N
<b>Ipocalcemia (Y/N)</b>	Y	N	Y	N
<b>Infezioni Cutanee</b>	Y	N	N	N
<b>Altre Infezioni</b>	Intestino	N	Intestino vie urinarie	N
<b>Malattie autoimmuni (Y/N)</b>	N	N	N	N
<b>Autoimmunità (specify)</b>	N	N	N	N
<b>Ritardo psicomotorio</b>	Y	Y	Y	N
<b>Altri familiari affetti (Y/N)</b>	N	N	N	Y

In tre pazienti (pt 1, 2, 3) la diagnosi di sindrome di DiGeorge risale alla nascita, in seguito al riscontro di manifestazioni tipiche della malattia. In un paziente (pt 2) dominavano gli effetti della malformazione cardiaca, con comparsa di un episodio di shock da ipoperfusione sistemica e cianosi metabolica grave nel quarto giorno di vita. Negli altri due pazienti erano presenti i sintomi dell'ipocalcemia neonatale (pt 1, 3), come la tetania, e gli aspetti fenotipici tipici, con dismorfismi del volto, ma anche di mani e piedi (pt 1, 3).

Nel paziente per cui la diagnosi è stata ottenuta in età adulta (pt 4), questa è da attribuirsi non al riscontro di manifestazioni clinicamente evidenti, bensì di una familiarità. Estendendo le indagini genetiche dal figlio affetto ai familiari più stretti,

è stata riscontrata la delezione 22q11.2 anche nel padre, per il quale fino a quel momento non era stata sospettata la malattia.

In nessun caso la diagnosi prenatale è risultata dirimente per giungere alla diagnosi.

In tutti i pazienti, la diagnosi di sindrome di DiGeorge è stata confermata mediante l'analisi citogenetica molecolare, con l'esame FISH del cariotipo che ha dimostrato la microdelezione 22q11.2.

Anomalie cardiache erano evidenti alla nascita in tre pazienti (pt 1, 2, 3). Tuttavia in due pazienti si trattava di una pervietà del forame ovale, con un minimo shunt, poco significativo dal punto di vista emodinamico e quindi destinato a risolversi spontaneamente (pt 1, 3). In un paziente invece vi era una cardiopatia complessa: aorta interrotta con valvola aortica bicuspidale, difetti interatriale e interventricolare, ectasia del tronco polmonare e pervietà del dotto arterioso (pt 2). Tale quadro ha necessitato di un intervento cardiocirurgico correttivo di ricostruzione dell'aorta, eseguito nel decimo giorno di vita.

Anomalie otorinolaringee erano presenti in un paziente che presentava una stenosi dei condotti uditivi bilaterale ed una laringomalacia di tipo III (pt 1).

Alterazioni ortopediche erano presenti in tre pazienti: scoliosi, scapola alata, ipotonia muscolare e valgismo delle ginocchia (pt 1, 2, 3).

Un paziente aveva un'agenesia renale unilaterale (pt 4).

Tre pazienti soffrivano di una compromissione dello sviluppo psicomotorio che ne ha giustificato la presa in carico da parte del neuropsichiatra infantile (pt 1, 2, 3).

Dei quattro pazienti solo uno presentava familiarità: si trattava di un caso rimasto non diagnosticato fino all'età adulta, quando il riscontro della sindrome nel figlio ha permesso di chiarire il quadro nel padre (pt 4).

I pazienti mostravano tutti una linfopenia lieve o assente, Tab 2.

I pazienti in esame hanno presentato un numero di episodi infettivi all'anno variabile da un minimo di 2 fino a un massimo di 7. Nella maggior parte dei casi erano infezioni delle alte vie respiratorie, categoria nella quale vanno annoverate anche le otiti medie acute. In tre pazienti l'infezione aveva coinvolto anche il tratto respiratorio inferiore (pt 1, 2, 3). In due pazienti si erano verificati episodi di gastroenterite (pt 1, 3). Meno frequenti le infezioni del tratto urinario (pt 3) e cutanee (pt 1).

<b>Tab 2</b>	<b>PT 1</b> <b>Cell/μl</b>	<b>PT 2</b> <b>Cell/μl</b>	<b>PT 3</b> <b>Cell/μl</b>	<b>PT 4</b> <b>Cell/μl</b>
<b>CD3+</b>	2733 (59,7)	1355 (48,8%)	880 (66,2%)	1080 (41,9%)
<b>CD3+CD4+</b>	1742 (38,1%)	715 (25,8%)	431 (22,4%)	756 (29,4%)
<b>CD4+CD45RO+</b>	(7,3%)	(7,7%)	(13,6%)	(25,9%)
<b>CD4+CD45RA+</b>	(21%)	(9,6%)	(10,5%)	(1,6%)
<b>CD4+RTE</b>				
<b>HLA-DR+</b>	(29,6%)	(29,6%)	(25,5%)	(30%)
<b>CD3+CD8+</b>	804 (17,6%)	436 (15,7%)	305 (23%)	315 (12,2%)
<b>TCR γδ</b>	(4,8%)	(7,9%)	(11,3%)	(1,1%)
<b>CD4+/CD8+</b>	2,2	-	1,0	2,4
<b>CD19+</b>	1144 (25%)	847 (30,5%)	278 (20,9%)	333 (12,9%)
<b>CD16+CD56+</b>	467 (10,2%)	522 (18,8%)	114 (8,6%)	1098 (42,6%)
<b>WBC</b>	8410	6660	5630	7230
<b>Neutrofil</b>	2970 (35,3%)	2580 (38,7%)	3920 (69,7%)	4160 (57,5%)
<b>Linfociti</b>	4160 (49,5%)	3200 (48%)	1070 (19,0)	2460 (34%)
<b>Monociti</b>	830 (9,9%)	360 (5,3%)	490 (8,7%)	460 (6,4%)

La suscettibilità alle infezioni ha giustificato il ricorso ad una profilassi antibiotica continuativa in tre pazienti (pt 1, 2, 3).

Il profilo immunologico, studiato mediante il ricorso ad esami mirati, è risultato normale in tutti i pazienti, eccetto uno che presentava un lieve difetto immunologico, con riduzione del numero di linfociti T di minima entità (pt 3). In nessun paziente è stato riscontrato un difetto dell'immunità umorale, descritto in letteratura come associato a fenomeni autoimmunitari: in questi casi non è stata riscontrata alcuna manifestazione autoimmune.

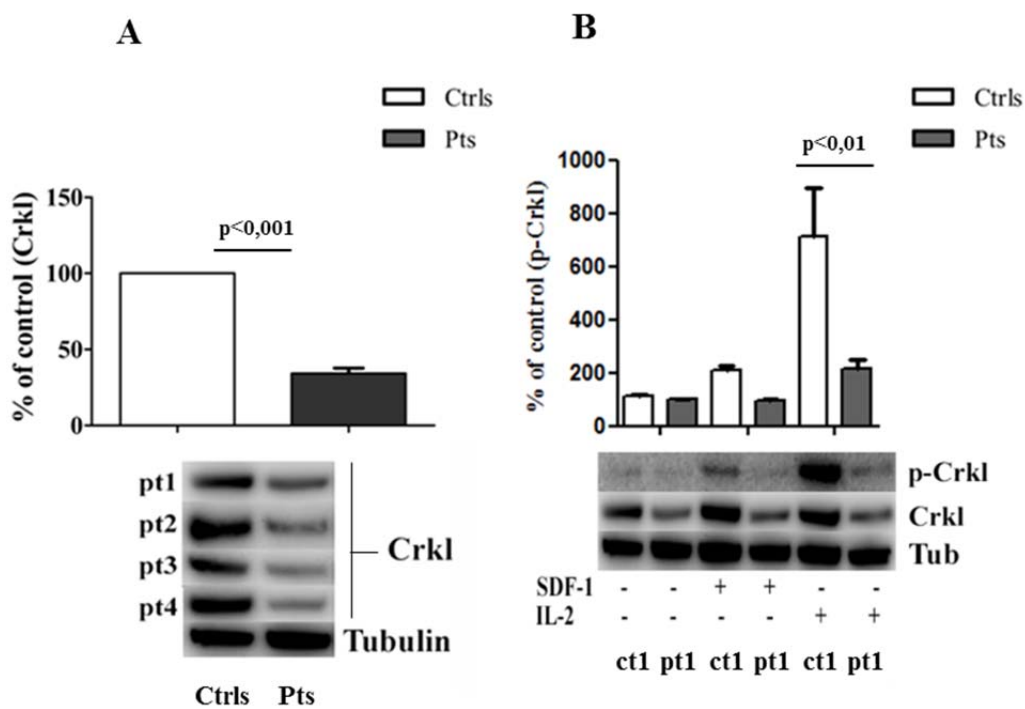
In un caso vi era agenesia del timo (pt 2), tuttavia non responsabile di una compromissione della funzione T-cellulare.

### **Diminuiti livelli di Crkl e fosfo-Crkl in pazienti con del22q11.**

Per valutare i livelli di Crkl totale e fosforilato è stata effettuata una analisi western-blot su linfociti PHA-T, tale indagine ha mostrato un marcata riduzione dei livelli di proteina totale Crkl nei pazienti se comparata con i soggetti di controllo (Fig 8, A).

Successivamente noi abbiamo valutato se fosse riscontrabile una riduzione dei livelli

di fosforilazione di Crkl in pazienti con del22q11 rispetto ai controlli sani. Per verificare ciò, abbiamo stimolato linfociti PHA-T con IL-2 e SDF-1 $\alpha$ , già noti per promuovere la fosforilazione di Crkl. L'analisi WB ha mostrato che entrambi, IL-2 e SDF-1 $\alpha$ , inducono la fosforilazione di Crkl anche se SDF-1 $\alpha$ , in modo meno forte di IL-2. Nondimeno, abbiamo osservato un drastico decremento della fosforilazione di Crkl (pY207) nei pazienti rispetto ai controlli, il fenomeno era più marcato sotto effetto di IL-2 (Fig 8, B).



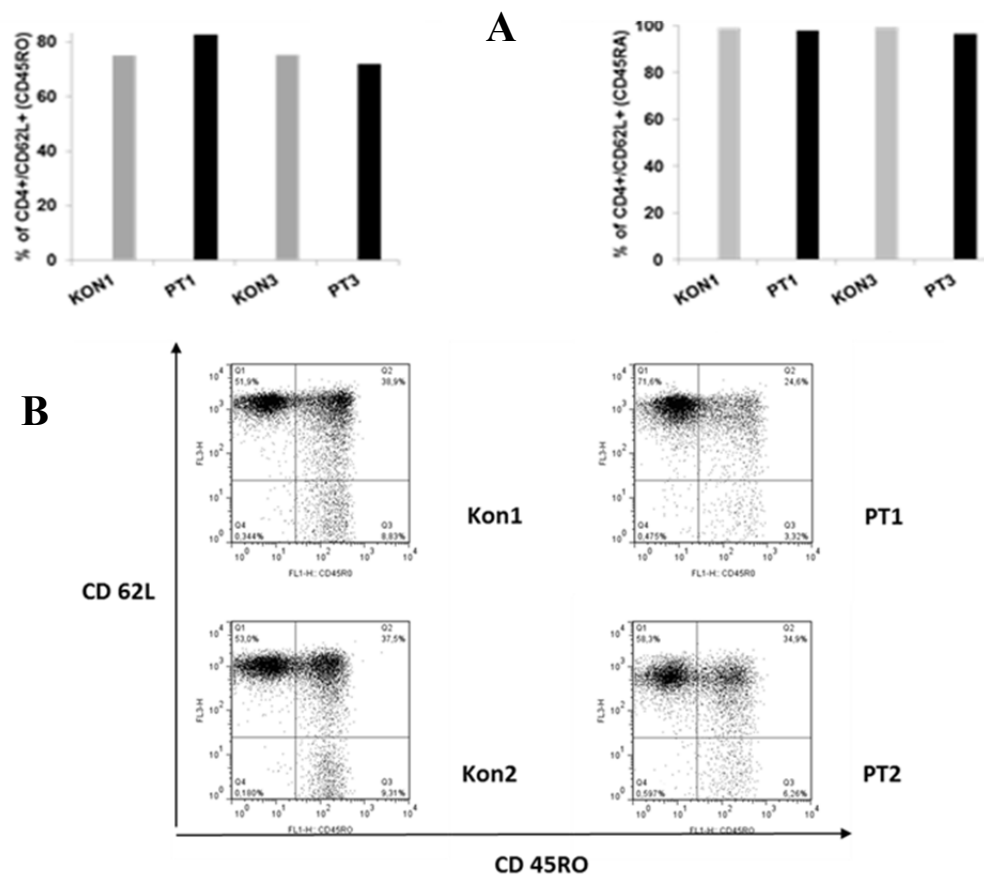
**Fig 8: A, studio dei livelli della proteina Crkl nei pazienti versus controlli sani. B, livelli di p-Crkl in blasti PHA-T stimolati con IL-2 o SDF-1 $\alpha$ .**

I livelli di Crkl e p-Crkl in un gruppo di pazienti e di controlli sani (pannello superiore) e foto del WB rappresentativa dell'analisi condotta in questi pazienti (pannello inferiore). I pazienti con delq22.11 mostrano una forte riduzione dei livelli di proteina totale e di p-Crkl quando comparati con i controlli sani.



**Sbilanciamento della proliferazione, alterata espressione dei markers di attivazione e decrementata apoptosi nei pazienti con del22q11.**

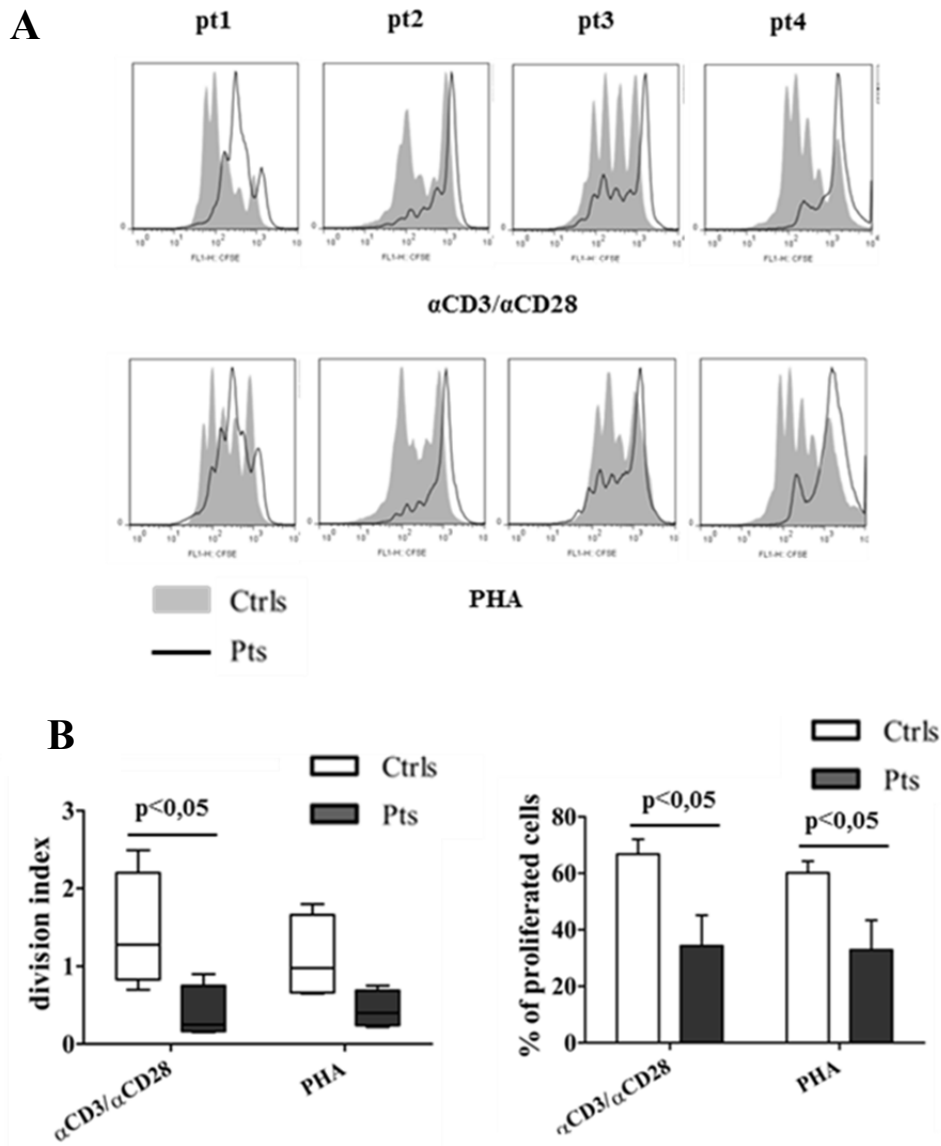
Per investigare se la aplo-issufficienza di Crkl osservata nei pazienti con del22q11 si accompagnasse ad una alterazione delle funzioni cellulari nei linfociti T, noi abbiamo condotto alcuni saggi funzionali, relativamente a quei processi nei quali Crkl è noto essere coinvolto. E' stata valutata anche l'espressione di CD62L, ma non abbiamo osservato alcuna differenza nell'espressione di superficie di questo marcatore, normalmente poco espresso in topi deleti per entrambe le forme di stat5 (Fig 9, A, B).



**Fig 9: A, studio dei livelli di espressione di CD62L su linfociti T helper Memory e Naive nei pazienti versus controlli sani. B, dot plot esemplificativi di un paziente e di un controllo della stessa analisi.**

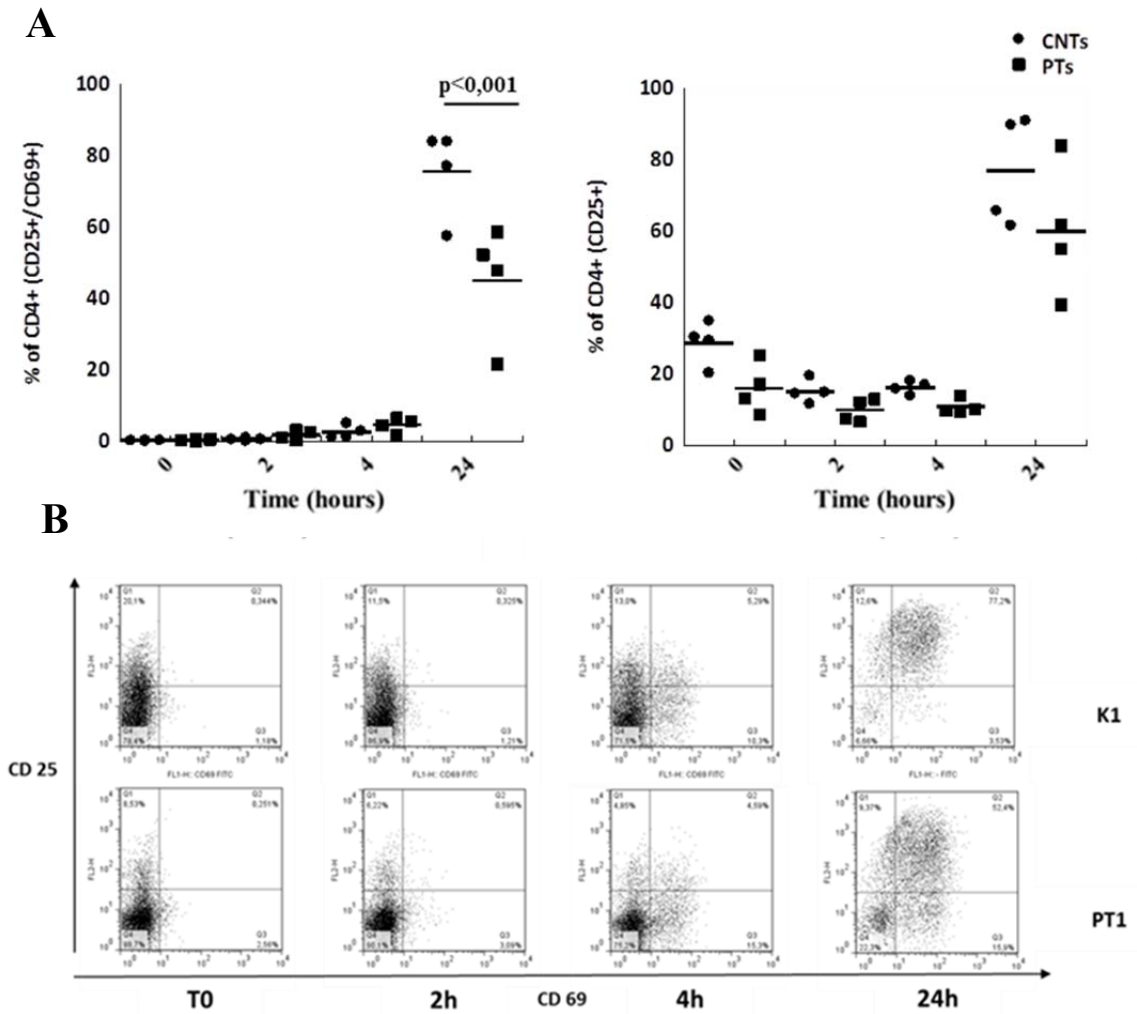
*A, I livelli di espressione del CD62L (pannello superiore) appaiono del tutto entro la norma. B, Plot di analisi di espressione su T helper Memory di un paziente e un controllo sano (pannello inferiore).*

La proliferazione è stata condotta sui PBMCs dopo 72 ore di attivazione del TCR o sotto stimolazione con PHA. I pazienti sottoposti ad analisi hanno mostrato una riduzione del rateo proliferativo, sia come division index sia come percentuale di cellule proliferate, la percentuale di queste è stata calcolata a partire dalla seconda generazione in poi (Fig 10, A, B).



**Fig 10: A, B, Pannello del saggio proliferativo.** A, sopra sono mostrati gli istogrammi dei quattro pazienti (tratto in nero) comparati ai relativi controlli (tratto in grigio). I pazienti presentano un numero inferiore di generazioni. B, sotto la % di cellule proliferate (destra) e l'indice di divisione (sinistra) mostra un significativo decremento della proliferazione dopo innesco del TCR.

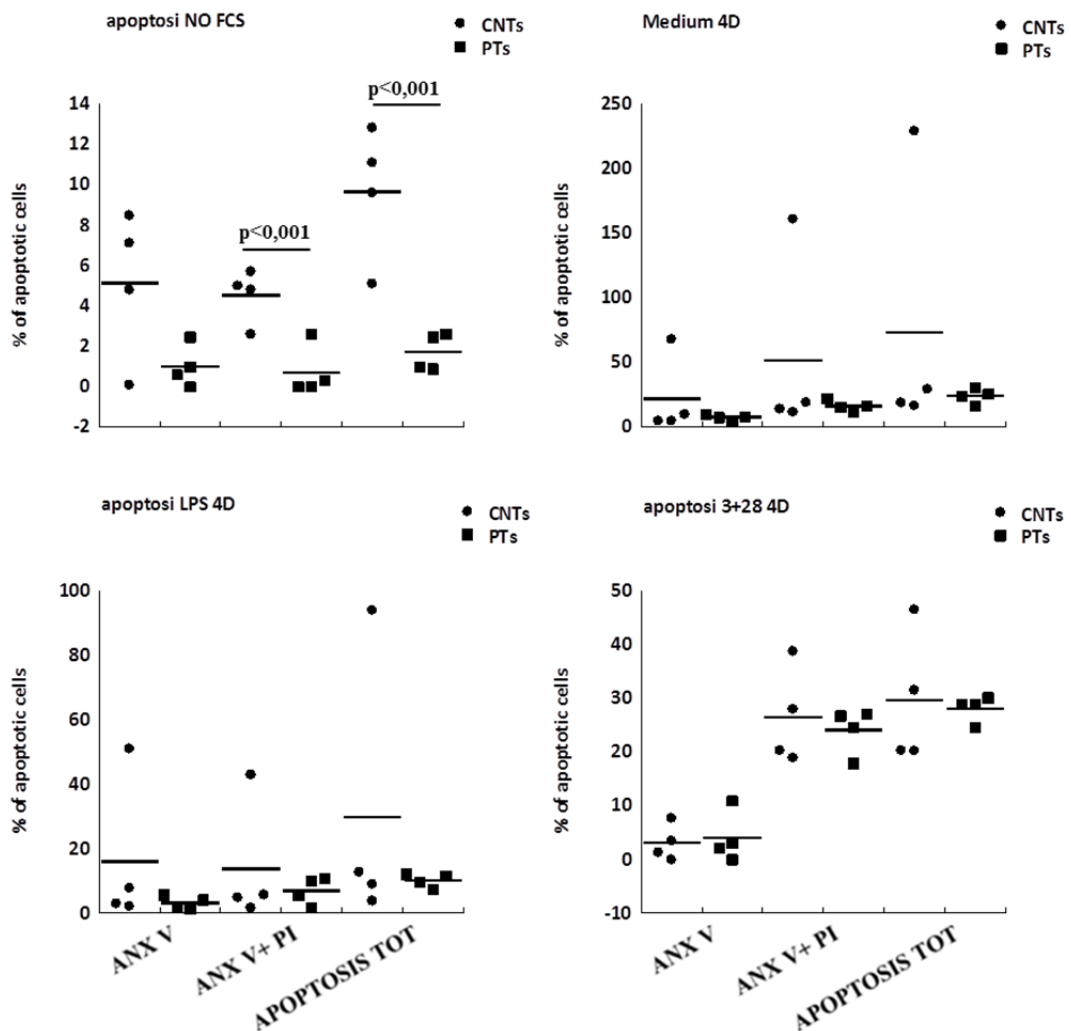
Questa ridotta proliferazione e la diminuita fosforilazione di Crkl sotto stimolo di IL-2, ci ha indotti a verificare se sotto innesco del TCR, attivato insieme ad IL-2 potesse anche alterare l'espressione di markers di attivazione sui linfociti T. Così, abbiamo analizzato l'espressione di CD69, CD25 su linfociti T stimolati con IL-2 e anticorpi  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28. Normalmente, l'espressione di CD69 and CD25, incrementa sui linfociti T sotto effetto IL-2, in particolare a 24 ore (Fig 11, A, B).



**Fig 11: A, B, Pannello delle analisi citometriche, analisi dei markers di attivazione cellulare, CD25 e CD69, fatta sui linfociti T helper. A, cambiamenti dei markers di attivazione rivelano la riduzione del subset di linfociti T-helper CD25+CD69+ nei pazienti, rispetto ai controlli, dopo 24h di attivazione del TCR. B, esemplificazione di andamento dell'espressione del subset di linfociti T helper CD25+/CD69+ in un paziente rispetto ad un controllo sano.**

Comunque, abbiamo osservato un significativo decremento nel numero di T helper memory CD25+CD69+ nelle cellule dei pazienti rispetto ai soggetti di controllo, ma solo dopo 24 ore di stimolazione (Fig 11, A, B).

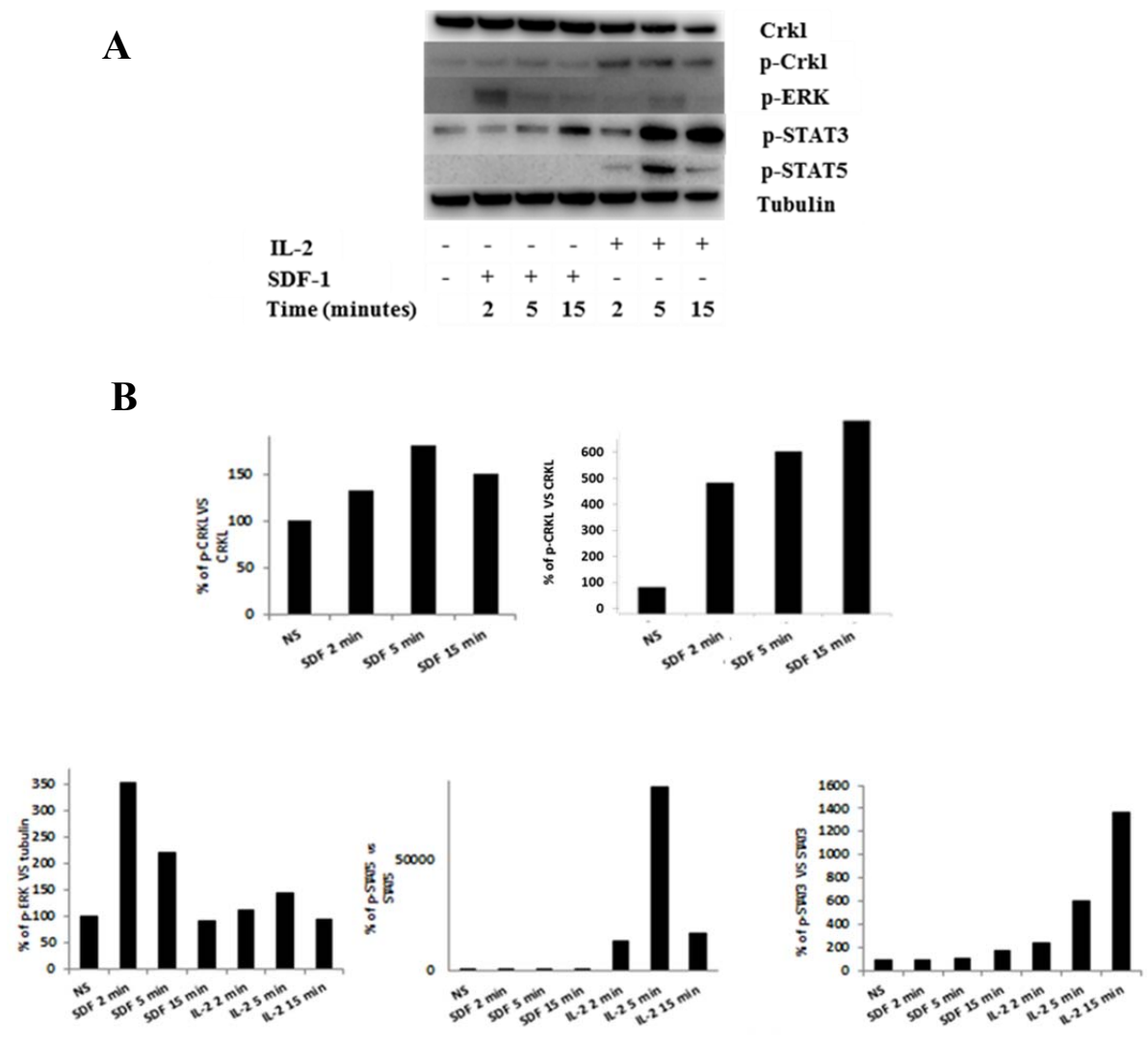
Su PBMCs di pazienti e controlli abbiamo anche esaminato l'apoptosi, dopo 96 ore di stimolazione con LPS o per innesco del TCR, o dopo stimolazione con IL-2 o in semplice medium senza siero, piuttosto che in medium completo. Noi abbiamo osservato un decremento della apoptosi solo quando le cellule erano trattate con medium senza siero, cioè solo in deprivazione di siero (Fig 12) mentre nelle altre condizioni nessuna differenza è stata osservata fra pazienti e controlli quando i due gruppi sono stati comparati, rispetto alle altre condizioni su menzionate.



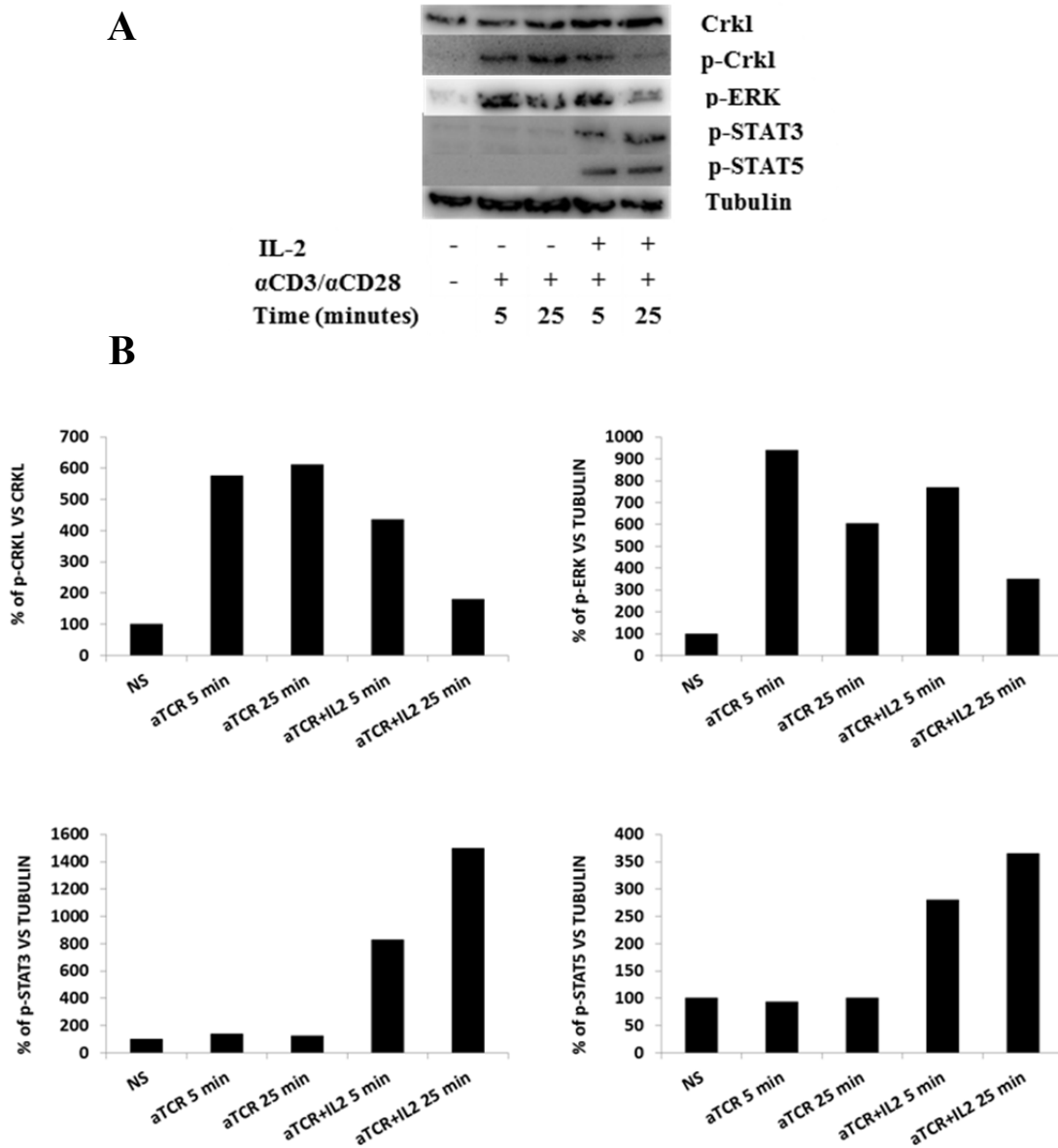
**Fig 12: Analisi dell'apoptosi.** Si evidenzia una Bassa risposta apoptotica dei PBMCs di pazienti, dopo 96 ore in condizioni di deprivazione di siero. Nessuna alterazione è stata osservata nelle altre condizioni testate.

**IL-2 e il TCR attivano fortemente Crkl.**

Preventivamente su Blasti PHA-T di controllo era stata valutata, in WB, l'andamento della attivazione di Crkl e di altre proteine attivate via IL-2, SDF-1 $\alpha$  e triggering del TCR. IL-2 attiva stat3, stat5 e Crkl, mentre SDF-1 $\alpha$  lo stimola piú debolmente. (Fig 13, A, B). Anche l'innesco del TCR mostra di attivare marcatamente Crkl (Fig 14, A, B).



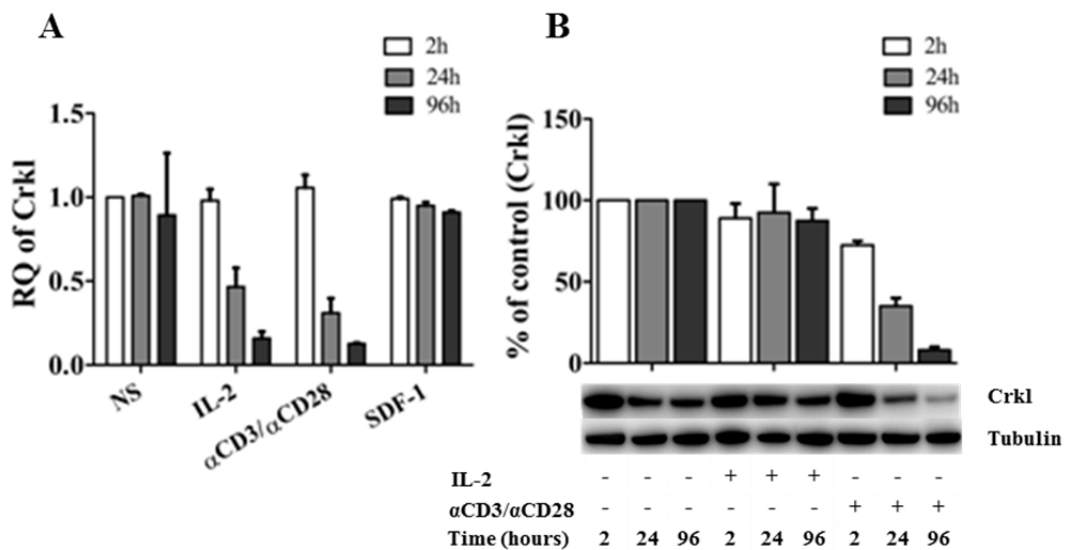
**Fig 13: Analisi della risposta ad IL-2 ed a SDF-1 $\alpha$ , su blasti di controllo.** A. è rappresentata il WB dell'andamento dei p-Crkl, p-ERK1/2, p-stat3 e p-stat5. In B sono rappresentati i grafici di normalizzazione. Si evidenzia che IL-2 attiva fortemente Crkl, stat3 e stat5, ma poco le ERK1/2. Viceversa SDF-1 $\alpha$  attiva poco Crkl e fortemente le ERK1/2.



**Fig 14: Analisi della risposta all'innescò del TCR, con e senza IL-2, su blasti di controllo.** A. è rappresentato il WB dell'andamento dei p-Crkl, p-ERK1/2, p-stat3 e p-stat5. In B sono rappresentati i grafici di normalizzazione. Si evidenzia che il TCR promuove sia da solo sia in presenza di IL-2 la fosforilazione di Crkl. Mentre la fosforilazione di stat3 e stat5, è promossa solo in presenza di IL-2. Le ERK1/2 sono maggiormente attivate dall'innescò del TCR che in presenza di IL-2.

### IL-2 e il triggering del TCR modulano l'espressione di Crkl

L'analisi di Real-Time su linfociti T CD4+ di donatori sani, stimolati con IL-2 o anticorpi  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28, ma non con SDF-1 $\alpha$ , riducono i livelli di espressione di mRNA di Crkl (Fig 15, A, B). Sotto le stesse condizioni, l'analisi in WB ha dimostrato che l'attivazione del TCR con  $\alpha$ CD3/ $\alpha$ CD28 era la sola condizione in cui i livelli di proteina totale, oltre che di mRNA, si riducevano, infatti IL-2 da sola non era in grado di ridurre i livelli di proteina di Crkl.



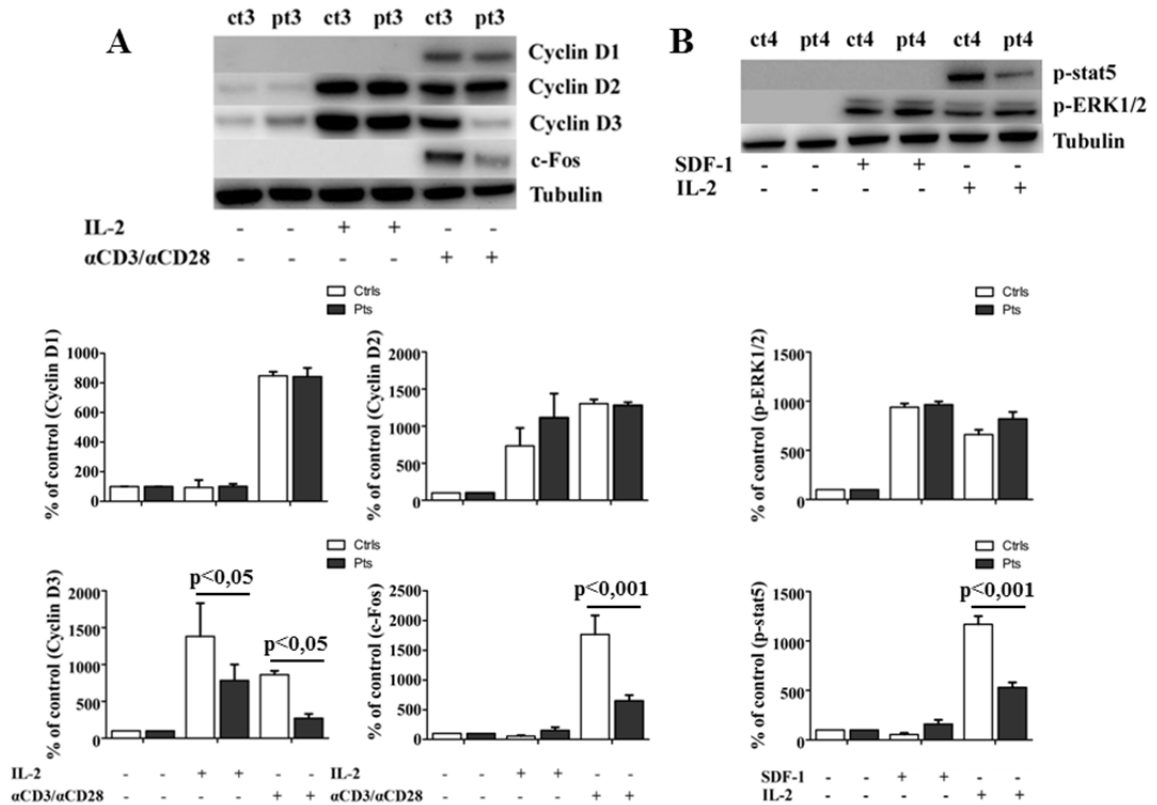
**Fig 15** Modulation dell'espressione di Crkl. A, Il TCR triggering e la stimolazione con IL-2, ma non con SDF-1 $\alpha$ , fa decrementare i livelli di mRNA di Crkl in linfociti T helper totali di un controllo sano. B, l'attivazione del TCR ma non IL-2 da sola riduce i livelli della proteina Crkl.

### c-Fos e la fosforilazione di stat5 sono ridotti in pazienti con del22q11.

La sbilanciata risposta proliferativa e la alterata fosforilazione di Crkl osservata nei pazienti ci ha indotti a valutare i livelli di espressione delle principali proteine regolatorie del ciclo cellulare, ossia le cicline, e di alcuni fattori chiave che sono coinvolti nel processo proliferativo e attivate da IL-2, quali lo stat5 e il pathway delle MAPK chinasi (ERK1/2).

L'analisi WB di linfociti PHA-T sia di pazienti che di soggetti di controllo, stimolati

overnight per attivazione del TCR ha mostrato delle chiare riduzioni dei livelli del fattore trascrizionale c-Fos nei pazienti. Abbiamo anche osservato un calo dei livelli della ciclina D3, mentre la ciclina D1 e D2 non apparivano alterate, nei pazienti (Fig 16, A). Per di più, la fosforilazione di stat5 era anch'essa diminuita nei pazienti, quando stimolati con IL-2, mentre le ERK1/2 erano sostanzialmente invariate, fra i due gruppi (Fig 16, B).

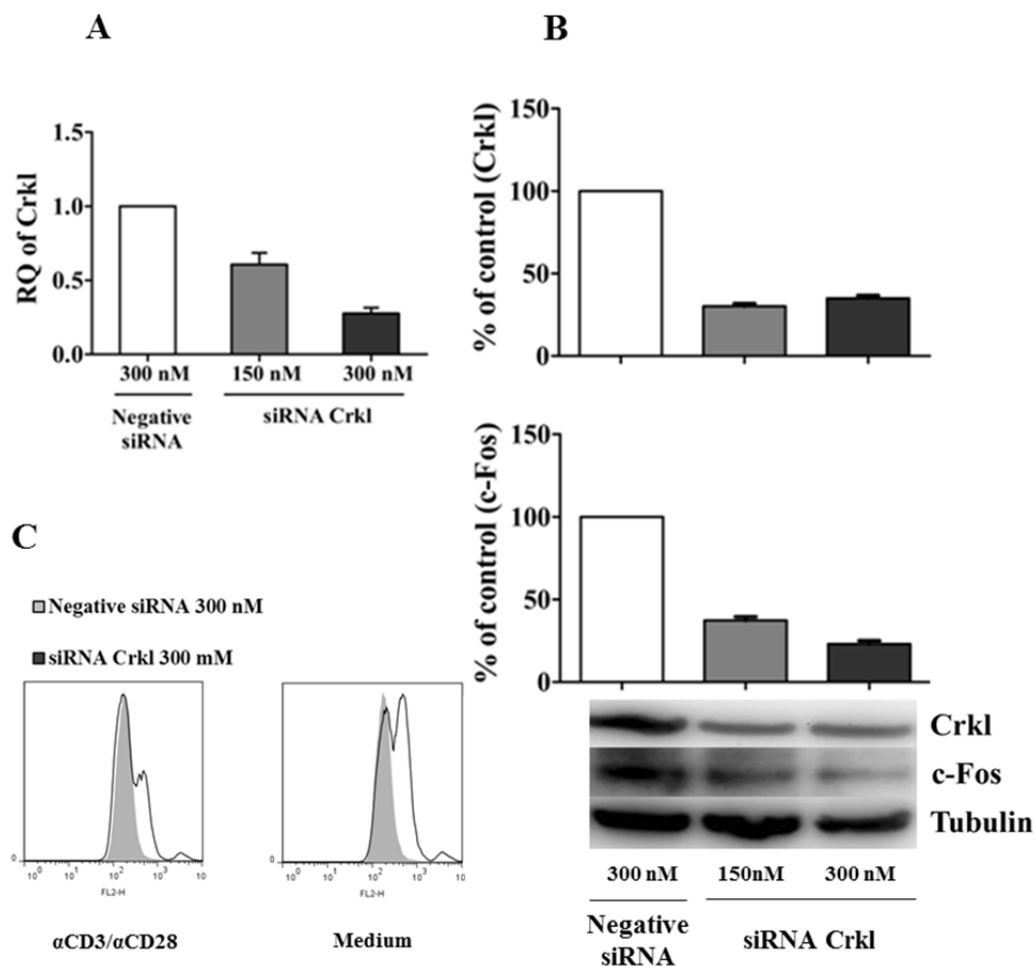


**FIG 16. A, WB rappresentativo di un controllo e di un paziente mostrante la modulazione dell'espressione delle cicline D1, D2, D3 e di c-Fos e B, di p-stat5. in blasti PHA-T. L'Analisi della ciclina D3 mostra una riduzione dei livelli, mentre quella dei livelli di c-Fos mostra una drastica riduzione, nei pazienti sotto innesco del TCR. B, WB analisi mostra decrementati livelli di p-stat5 ma non delle p-ERK1/2, nei pazienti, quando stimolti con IL-2.**



**Il silenziamento di Crkl in linee Jurkat ha mostrato la riduzione dei livelli di c-Fos e un concomitante calo della proliferazione.**

Dopo la transfezione di un siRNA Crkl specifico, i livelli di mRNA di Crkl apparivano evidentemente ridotti, in linee Jurkat, dopo 72 ore dalla transfezione con elettroporatore, rispetto alla condizione con siRNA non-Target. Questa riduzione di mRNA di Crkl si accompagnava ad una riduzione anche dei livelli di proteina totale, come osservato dalla analisi in WB. La stessa analisi mostrava anche un calo della proteina c-Fos, sempre analizzata a 72 ore (Fig 16, A, B).



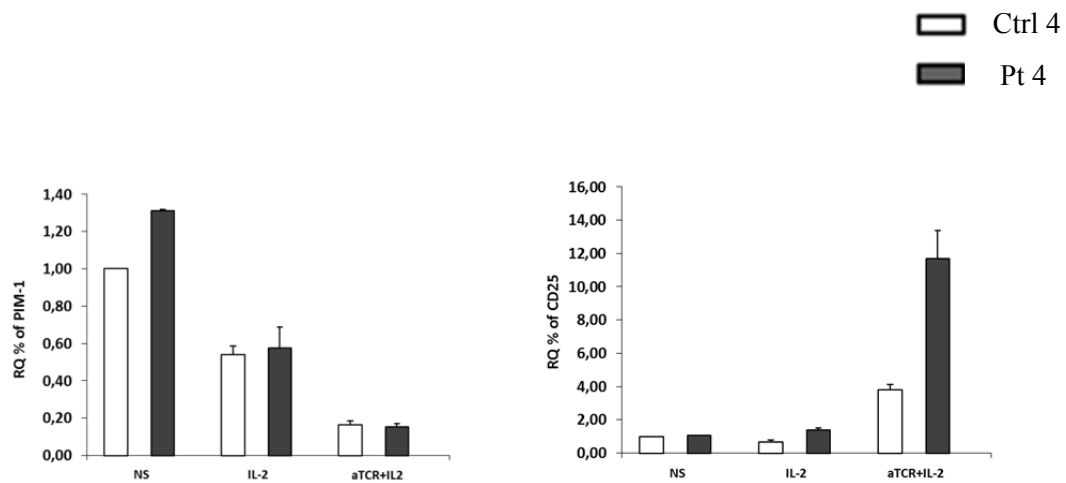
**FIG 16. Silenziamento di Crkl in cellule Jurkat.** A, siRNA Crkl specifico riduce i livelli di mRNA in modo dose dipendente. B, L'analisi in WB di Crkl e di c-Fos mostra un decremento dei livelli di entrambe le proteine dopo trattamento con siRNA per Crkl. C, l'analisi citometrica mostra una alterata proliferazione nelle cellule sia sotto attivazione del TCR ma anche in medium da solo, la riduzione è tuttavia solo parziale, con permanenza di generazioni antecedenti a quella più avanzata.

L'analisi della proliferazione al CFSE sempre su linee Jurkat trattate con siRNA Crkl specifico mostrava, a 72 ore una certa riduzione del rateo proliferativo, quando le cellule erano comparate con quelle trattate con siRNA Non Target (Fig 16, C), evidenziando la permanenza di generazioni antecedenti all'ultima, nelle jurkat con Crkl silenziato, rispetto a quelle trattate con un siRNA non-target.

### **Analisi di espressione di PIM-1 e CD25**

Infine è stata eseguita, per ora su un solo paziente, l'analisi di espressione del recettore ad alta affinità di IL-2, e di un gene espresso per attivazione di stat5 quale PIM-1. L'analisi è stata condotta sempre su Blasti PHA-T starvati per 24 ore senza stimoli, in medium completo, e poi restimolati per 18 ore con  $\alpha$ CD3 5 $\mu$ g/ml più  $\alpha$ CD28 750ng/ml o IL-2 200U/ml.

L'analisi ha mostrato che non sono state riscontrate differenze fra paziente (pt 4) e controllo per quanto riguarda l'espressione di PIM-1. Per quanto riguarda invece l'espressione del CD25 sorprendentemente abbiamo osservato, sotto innesco del TCR, un incremento dell'espressione dell mRNA del CD25 nel pt 4 rispetto al relativo controllo (Fig 17). Questo dato, apparentemente contrario ai livelli di espressione di CD25 osservati in citometria, misurati su campioni di sangue stimolati, ove abbiamo osservato una più bassa espressione di CD25 nei pazienti rispetto ai controlli, potrebbe essere legato a meccanismi non ancora chiari, forse un incremento dell'espressione del messaggero potrebbe essere un meccanismo di correzione di una minore espressione del CD25 sui linfociti CD4. Va comunque evidenziato uno sbilanciamento, nel pt 4, nell'entità dei livelli di mRNA di CD25 rispetto al controllo, anche se il significato ci è poco chiaro. Precisiamo inoltre che l'indagine citometrica evidenzia un numero di cellule CD4+ positive al CD25, inferiore a quello dei controlli. E non una minore densità di espressione del CD25 sulle cellule studiate. Questo aspetto va comunque sicuramente approfondito con ulteriori indagini su altri soggetti.



**FIG 17.** *Analisi dell'espressione di PIM1 (grafico a sinistra) e di CD25 (grafico a destra). L'analisi in Real-Time dei livelli di espressione di PIM-1 non ha evidenziato differenze sostanziali, mentre l'espressione del CD25 appare più alta, nel paziente, ma solo nella condizione di innesco di TCR.*

## CONCLUSIONI

*La tattica è il regno dei tenenti e dei capitani; perchè evolva c'è bisogno di loro, liberi di pensare e di sbagliare, di osare, ardire. E c'è bisogno di generali che li facciano crescere liberi e che, muovendo freccette o pensando a operazioni stellari e sensibilità politiche, non si siano dimenticati di essere stati a loro volta, tenenti e capitani.*

*Generale di Corpo d'Armata Fabio Mini*

### **Discussione**

Noi qui abbiamo evidenziato una riduzione della proteina totale Crkl in pazienti affetti da del22q11. Anche i linfociti T di questi pazienti, dopo innesco del TCR, mostravano una ridotta fosforilazione di Crkl e un decremento dei livelli del fattore trascrizionale c-Fos facente parte a sua volta del complesso trascrizionale AP-1 il quale è normalmente coinvolto nella proliferazione (38). Oltre che la proliferazione, AP-1 modula l'espressione di fattori chiave della proliferazione, quali la ciclina D1 la quale promuove la transizione dalla fase G1 alla fase S e G2 del ciclo cellulare (39).

Per di più abbiamo mostrato l'interazione fra Crkl e la sub-unità c-Fos, dopo attivazione del TCR, non solo su blasti PHA-T di pazienti ma anche su cellule Jurkat dopo silenziamento con un siRNA specifico per Crkl. Questi risultati indicano che la riduzione di c-Fos è correlabile alla riduzione di Crkl nei pazienti. Questi dati sono anche in accordo con ciò che è stato recentemente osservato su linee di carcinoma invasive dei dotti (IDC) in cui gli autori hanno mostrato che l'overespressione di Crkl in linee MDA-MB-435 è associata con metastasi dei linfonodi e con la taglia del tumore, e qui si è osservato anche che l'over-espressione di Crkl promuove il passaggio dalla fase G1 alla fase S e G2 del ciclo cellulare.

In aggiunta, in linee cellulari MDA-MB-453 le quali normalmente over-esprimono Crkl, esse mostrano una riduzione della proliferazione e la fuoriuscita dal ciclo cellulare dopo silenziamento di Crkl. Questi risultati si correlavano ad un decremento dei livelli della ciclina D1 (12). L'espressione della ciclina D1 si dimostra essere accompagnato con l'attivazione del pathway delle MAPK-ERK1/2 e p38 chinasi (27, 40).

La associazione fra over-espressione di Crkl e incrementata proliferazione, così come, la sua down-regolazione e l'uscita dal ciclo cellulare sono anche state dimostrate in altre linee tumorali (13).

Noi non abbiamo osservato alcuna alterazione dei livelli di espressione della ciclina D1 nel nostro gruppo di pazienti. Questa discrepanza può essere legata a differenze nel tipo di linea cellulare usate negli esperimenti, in particolare nel nostro caso erano blasti PHA-T e rispetto a linee di carcinomi, nel caso sopra riportato.

## Conclusioni

La proliferazione via attivazione del TCR e produzione di IL-2 comporta la attivazione di svariati pathways. Ci sono almeno 3 principali vie dopo attivazione di IL-2R $\beta$ . La prima va dalla tirosina 338 e la proteina adattatrice Shc la quale attiva il complesso Grb2/Sos e le chinasi della famiglia Ras (41,42). La seconda via passa tramite GAB2 e attivazione di PI3K (43-45). E infine, la terza coinvolge la fosforilazione della tirosina 510 e attivazione di stat5 (46,47).

Noi abbiamo allora focalizzato la nostra attenzione sulla attivazione di stat5 poiché esso forma complessi con Crkl il quale migra al nucleo e attiva la trascrizione di geni bersaglio (6, 7). In aggiunta la inibizione di JAK3 con un potente inibitore come AG-490 in cellule murine D10 compromette la proliferazione indotta da IL-2. Questo effetto era determinato da una perdita della abilità DNA legante sia di stat5 chee dal complesso AP-1 (48).

In aggiunta in topi NOD con mutazioni nel DNA binding domain di stat5, l'over-espressione di Crkl dimostra che essa ripristina la capacità DNA legante di stat5 e esperimenti di coimmunoprecipitazione di Crkl-stat5 mostrano l'interazione di queste due proteine a formare complessi che si legano a specifiche sequenze riconosciute da stat5 (7). I linfociti T di topi knockout per stat5 mostrano un deficit nella proliferazione e una riduzione nei livelli delle cicline D2 e D3 dopo attivazione del TCR. Questi topi erano fenotipicamente simili a quelli con deficit di IL-2R $\beta$  (23). Anche nella Leucemia Mieloide Cronica (CML) stat5 appare essere più attivo (49, 50), e questa è una linea tumorale in cui è ben nota la iper-fosforilazione di Crkl, per interazione con bcr-Abl.

Noi abbiamo anche osservato che la fosforilazione di stat5 è ridotta in linfociti T attivati stimolati con IL-2 e con decremento, variabile, della ciclina D3 nei pazienti quando comparate con soggetti di controllo.

In letteratura le linee murine CTLL2 e le BA/FG mostrano che sia stat5 che il fattore trascrizionale Sp1 sono necessari per l'espressione della ciclina D2 (24), tuttavia noi non abbiamo osservato alcuna differenza nei livelli della ciclina D2. Benché ci sono alcune differenze nel pattern di espressione di queste molecole, nondimeno, i nostri dati confermano le interazioni fra Crkl e stat5.

Gli adattatori della famiglia Crk agiscono da ponte fra varie proteine. Questa interazione con altre proteine appare avvenire sia attraverso il dominio SH2 il quale

## Conclusioni

lega residui di tirosine fosforilate o tramite il dominio SH3 il quale si lega con le sue regioni idrofobiche a sequenze consensus ricche in prolina (2). Il dominio SH2 delle proteine della famiglia Crk è anche coinvolto nella attivazione dei linfociti T attraverso attivazione del TCR. Crkl anche interagisce con le proteine ZAP-70 e Cbl oltre che con PI3K nello stadio iniziale della attivazione del TCR (51,52). Le interazioni di Crkl sono un fenomeno complesso che modula le interazioni proteina proteina in molteplici processi cellulari. Così, è quindi possibile che la aplo-insufficienza di Crkl possa giocare un ruolo, benché non da sola, nella patogenesi di alcune delle disfunzioni osservate nei pazienti con del22q11.

Nei pazienti affetti da sindrome di DiGeorge spesso sono presenti malattie e manifestazioni autoimmuni. Spesso sono descritte la porpora trombocitopenica, l'anemia emolitica, diabete e psoriasi. Le proteine della famiglia Crk sono coinvolti nella apoptosi (53,54). Così, la ridotta risposta apoptotica osservata nei nostri pazienti potrebbe rappresentare un meccanismo di escape di linfociti T autoreattivi, ai meccanismi di selezione che normalmente avvengono nel timo, e può dare quindi una base per spiegare le forme di autoimmunità osservate in questa sindrome.

I pazienti con del22q11 sono fenotipicamente molto variabili, anche la proliferazione è spesso descritta come normale. I nostri risultati mostrano invece la presenza di differenze nella risposta proliferativa. Questa discrepanza potrebbe essere spiegata attraverso i differenti metodi impiegati nella determinazione della proliferazione o così come nella differenza degli stimoli impiegati, quali l'uso di anticorpi  $\alpha$ CD3 o mitogeni come PHA or PMA (55, 56). Il difetto proliferativo da noi osservato non è tuttavia un difetto totale ma solo un difetto parziale. Infatti è possibile generare linee linfoblastoidi di linfociti T, PHA-T cells, dai PBMCs dei pazienti, usando alte concentrazioni di IL-2 (1200 U/ml).

Ricordiamo poi succintamente che, oltre al difetto apoptotico e proliferativo, Crkl potrebbe essere coinvolto in altri fenomeni biologici che potrebbero spiegare i difetti dei linfociti T nella sindrome di DiGeorge. Ad esempio è stato dimostrato che il silenziamento di Crkl in linfociti T comporta una riduzione della adesione, sia via ICAM ma soprattutto una drastica riduzione di adesione via fibronectina. In oltre sempre il silenziamento di Crkl in linfociti T CD4+ determina una riduzione della quota di IL-2 prodotta dopo attivazione del TCR (57).

Così, Crkl è coinvolto in molti processi e interagisce con molte altre proteine quando indotto attraverso innesco e attivazione del TCR, o anche attraverso stimolazione con IL-2. Così potenzialmente ci possono essere altri attori che prendono parte nel delineare il difetto proliferativo da noi osservato. Questo anche potrebbe spiegare il perché il difetto proliferativo che si osserva nella sindrome di DiGeorge è spesso variabile e non coerente. L'origine dei disordini immunologici, nei soggetti con del22q11 sono poco compresi così, sarebbe importante analizzare anche gli altri attori coinvolti nella proliferazione quali le proteine RB o p21 o le chinasi dipendenti dalle cicline o le altre proteine del complesso AP-1, per definire in modo più esaustivo il pathway coinvolti nel difetto qui descritto.

Concludendo, noi abbiamo osservato un possibile legame fra la aplo-insufficienza di Crkl e il difetto proliferativo dei linfociti T e anche il decremento del fattore trascrizionale c-Fos in pazienti con del22q11, rispetto a soggetti sani. Noi abbiamo anche rilevato che la fosforilazione di stat5 è decrementata nei blasti T di pazienti stimolati con IL-2. Per giunta, abbiamo confermato questo dato anche su cellule Jurkat attraverso il silenziamento di queste cellule con un siRNA Crkl specifico.

A nostra conoscenza, questa è la prima evidenza sperimentale mostrante che il difetto proliferativo dei linfociti T nella sindrome di DiGeorge è associato alla aplo-insufficienza di Crkl la quale si accompagna alla riduzione del fattore trascrizionale c-Fos. Ulteriori indagini sono quindi necessarie per comprendere meglio il ruolo di Crkl nella sindrome del22q11.

**Riassumendo:** I pazienti con sindrome di DiGeorge e delezione eterozigote di Crkl mostrano una ridotta risposta proliferativa dei linfociti T. Questo è associato con un decremento sia della forma fosforilata che della forma totale di Crkl. Anche i livelli di espressione del fattore trascrizionale c-Fos appaiono diminuiti in questi soggetti. In aggiunta simili risultati sulla riduzione dell'espressione della proteina c-Fos vengono ottenuti in cellule Jurkat dopo silenziamento specifico di Crkl, suggerendo una cooperazione di queste due proteine nel processo proliferativo. Conducendo, quindi, a un deficit della proliferazione in questi soggetti.



### **Abbreviazioni**

AP-1 (Activator Protein 1),  
CFSE (Carbossifluoresceina succimidil estere),  
CML (leucemia mieloide cronica),  
Crkl (Crk-Like),  
del22q11 (delezione del braccio lungo del cromosoma 22),  
DGS (sindrome di DiGeorge),  
ERK1/2, (chinasi attivate da segnali extracellulari uno/due),  
IDC (Carcinoma invasivo dei dotti).  
IL-2 (Interleuchina-due),  
PHA (fitoemoagglutinina),  
PMA (Forbolo-miristato-13 acetato),  
SDF-1 $\alpha$  (Stromal Cell-Derived Factor one alpha),  
stat5 (Signal transducer and activator of transcription five),  
TCR (T Cell Receptor),

### **Ringraziamenti**

Voglio ringraziare anzitutto Le Dr.sse Tiziana Lorenzini e Micaela Milanesi per l'aiuto dato (in condizioni non facili) nel reperire i dati clinici dei pazienti.

E infine un ringraziamento particolare va al Dr. Kumar che, con il sottoscritto, si è impegnato costantemente per la riuscita di questo progetto, formando con me una piccola "banda di fratelli". Con lui voglio ricordare i "pochi" amici che ho trovato in questi sei anni presso il laboratorio "Nocivelli", ossia Giacomo e Massi, grazie ancora ragazzi !!

Infine un ringraziamento alla fondazione Fincantieri che ha finanziato la borsa di studio per questo dottorato.

## BIBLIOGRAFIA

*"I cherish the memory of a question my grandson asked me the other day, when he said: 'Grandpa, were you a hero in the war?' Grandpa said, 'No. But I served in a company of heroes.'"*

*Major Richard D. Winters  
Company "E", 2nd Battalion, 506th Parachute Infantry Regiment, US Army*

1. Feller SM. **Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles.** *Oncogene* 2001; 20: 6348-71.
2. Birge RB, Kalodimos C, Inagaki F, Tanaka S. **Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling.** *Cell Commun Signal* 2009; 7: 1-23.
3. Arai A, Aoki M, Weihua Y, Jin A, Miura O. **CrkL plays a role in SDF-1A - induced activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway through Ras and Rac to mediate chemotactic signaling in hematopoietic cells.** *Cell Signal* 2006; 18: 2162-71.
4. Schulze H, Ballmaier M, Welte K, Germeshausen M. **Thrombopoietin induces the generation of distinct Stat1, Stat3, Stat5a and Stat5b homo- and heterodimeric complexes with different kinetics in human platelets.** *Exp Hematol* 2000; 28: 294-304.
5. Oda A, Wakao H, Fujihara M, Ozaki K, Komatsu N, Tanaka S, et al. **Thrombopoietin and interleukin-2 induce association of CRK with STAT5.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 278: 299-305.
6. Fish EN, Uddin S, Korkmaz M, Majchrzak B, Druker BJ, Platanius LC. **Activation of a CrkL-stat5 signaling complex by type I interferons.** *J Biol Chem* 1999; 274: 571-3.
7. Laloraya M, Davoodi-Semiromi A, Kumar GP, McDuffie M, She JX. **Impaired Crkl expression contributes to the defective DNA binding of Stat5b in nonobese diabetic mice.** *Diabetes* 2006; 55: 734-41.
8. Smith JJ, Richardson DA, Kopf J, Yoshida M, Hollingsworth RE, Kornbluth S. **Apoptotic regulation by the Crk adapter protein mediated by interactions with Wee1 and Crm1/exportin.** *Mol Cell Biol* 2002; 22: 1412-23.
9. Smith JJ, Evans EK, Murakami M, Moyer MB, Moseley MA, Vande Woude G, et al. **Wee1-regulated apoptosis mediated by the crk adaptor protein in Xenopus egg extracts.** *J Cell Biol* 2000; 151: 1391-400.
10. Bell ES, Park M. **Models of crk adaptor proteins in cancer.** *Genes Cancer* 2012; 3: 341-52.
11. Yeung CL, Ngo VN, Grohar PJ, Arnaldez FI, Asante A, Wan X, et al. **Loss-of-function screen in rhabdomyosarcoma identifies CRKL-YES as a critical**

- signal for tumor growth.** *Oncogene* 2013; 32: 5429-38.
12. Zhao T, Miao Z, Wang Z, Xu Y, Wu J, Liu X, et al. **Overexpression of CRKL correlates with malignant cell proliferation in breast cancer.** *Tumour Biol* 2013; 34: 2891-7.
  13. Wang Y, Dong QZ, Fu L, Stoecker M, Wang E, Wang EH. **Overexpression of CRKL correlates with poor prognosis and cell proliferation in non-small cell lung cancer.** *Mol Carcinog* 2013; 52: 890-9.
  14. J ten Hoeve, RB Arlinghaus, JQ Guo, N Heisterkamp and J Groffen. **Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia.** *Blood* 1994; 84: 1731-6.
  15. de Jong R, ten Hoeve J, Heisterkamp N, Groffen J. **Crkl is complexed with tyrosine-phosphorylated Cbl in Ph-positive leukemia.** *J Biol Chem* 1995; 270: 21468-71.
  16. Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ. **CRKL is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia.** *J Biol Chem* 1994; 269: 22925-8.
  17. Guris DL, Fantes J, Tara D, Druker BJ, Imamoto A. **Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome.** *Nat Genet* 2001; 27: 293-8.
  18. Moon AM, Guris DL, Seo JH, Li L, Hammond J, Talbot A, et al. **Crkl deficiency disrupts Fgf8 signaling in a mouse model of 22q11 deletion syndromes.** *Dev Cell* 2006; 10: 71-80.
  19. Guris DL, Duester G, Papaioannou VE, Imamoto A. **Dose-dependent interaction of Tbx1 and Crkl and locally aberrant RA signaling in a model of del22q11 syndrome.** *Dev Cell* 2006; 10: 81-92.
  20. Scambler PJ. **The 22q11 deletion syndromes.** *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2421-6.
  21. Yamagishi H, Srivastava D. **Unraveling the genetic and developmental mysteries of 22q11 deletion syndrome.** *Trends Mol Med* 2003; 9: 383-9.
  22. Keyte A, Hutson MR. **The neural crest in cardiac congenital anomalies.** *Differentiation* 2012; 84: 25-40.
  23. Moriggl R, Topham DJ, Teglund S, Sexl V, McKay C, Wang D, et al. **Stat5 is required for IL-2-induced cell cycle progression of peripheral T cells.**

- Immunity 1999; 10: 249-59.
24. Martino A, Holmes JH 4th, Lord JD, Moon JJ, Nelson BH. **Stat5 and Sp1 regulate transcription of the cyclin D2 gene in response to IL-2.** J Immunol 2001; 166: 1723-9.
  25. Matsumura I, Kitamura T, Wakao H, Tanaka H, Hashimoto K, Albanese C, et al. **Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells.** EMBO J 1999; 18: 1367-77.
  26. Magné S, Caron S, Charon M, Rouyez MC, Dusanter-Fourt I. **STAT5 and Oct-1 form a stable complex that modulates cyclin D1 expression.** Mol Cell Biol 2003; 23: 8934-45.
  27. Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Müller R, Pouyssegur J. **Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway.** J Biol Chem 1996; 271: 20608-16.
  28. McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J. **Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1A and its receptor, CXCR4.** Dev Biol 1999; 213: 442-56.
  29. Newbern J, Zhong J, Wickramasinghe RS, Li X, Wu Y, Samuels I, et al. **Mouse and human phenotypes indicate a critical conserved role for ERK2 signaling in neural crest development.** PNAS 2008; 105: 17115-20.
  30. Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. **The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes.** Cell 1988; 54: 541-52.
  31. Hu E, Mueller E, Oliviero S, Papaioannou VE, Johnson R, Spiegelman BM. **Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes.** EMBO J 1994; 13: 3094-103.
  32. Pandey MK, Liu G, Cooper TK, Mulder KM. **Knockdown of c-Fos suppresses the growth of human colon carcinoma cells in athymic mice.** Int J Cancer 2012; 130: 213-22.
  33. Pai SR, Bird RC. **c-Fos expression is required during all phases of the cell cycle during exponential cell proliferation.** Anticancer Res 1994; 14: 985-94.

34. Güller M, Toualbi-Abed K, Legrand A, Michel L, Mauviel A, Bernuau D, et al. **c-Fos overexpression increases the proliferation of human hepatocytes by stabilizing nuclear Cyclin D1.** *World J Gastroenterol* 2008; 14: 6339-46.
35. Parrales A, Palma-Nicolás JP, López E, López-Colomé AM. **Thrombin stimulates RPE cell proliferation by promoting c-Fos-mediated cyclin D1 expression.** *J Cell Physiol* 2010; 222: 302-12.
36. Batolozzi G, Guglielmi M. **Pediatria. Principi e pratica clinica.** Elsevier Masson, 3° edizione.
37. Markert ML, Devlin BH, Alexieff MJ, Li J, McCarthy EA, Gupton SE, et al. **Review of 54 patients with complete DiGeorge anomaly enrolled in protocols for thymus transplantation: o outcome of 44 consecutive transplants.** *Blood* 2007; 109: 4539-47.
38. Abate C, Curran T. **Encounters with Fos and Jun on the road to AP-1.** *Semin Cancer Biol* 1990; 1: 19-26.
39. Resnitzky D, Gossen M, Bujard H, Reed SI. **Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system.** *Mol Cell Biol* 1994; 14: 1669-79.
40. Balmanno K, Cook SJ. **Sustained MAP kinase activation is required for the expression of cyclin D1, p21Cip1 and a subset of AP-1 proteins in CCL39 cells.** *Oncogene* 1999; 18: 3085-97.
41. Lord JD, McIntosh BC, Greenberg PD, Nelson BH. **The IL-2 receptor promotes proliferation, bcl-2 and bcl-x induction, but not cell viability through the adapter molecule Shc.** *J Immunol* 1998; 161: 4627-33.
42. Ravichandran KS, Burakoff SJ. **The adapter protein Shc interacts with the interleukin-2 (IL-2) receptor upon IL-2 stimulation.** *J Biol Chem* 1994; 269: 1599-602.
43. Gu H, Pratt JC, Burakoff SJ, Neel BG. **Cloning of p97/Gab2, the major SHP2-binding protein in hematopoietic cells, reveals a novel pathway for cytokine-induced gene activation.** *Mol Cell Biol* 2000; 20: 7109-20.
44. Gu H, Maeda H, Moon JJ, Lord JD, Yoakim M, Nelson BH, et al. **New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway.** *Mol Cell*

- Biol 2000; 20: 7109-20.
45. Gadina M, Sudarshan C, O'Shea JJ. **IL-2, but not IL-4 and other cytokines, induce phosphorylation of a 98-kDa protein associated with SHP-2, phosphatidylinositol 3'-kinase, and Grb2.** J Immunol 1999; 162: 2081-6.
  46. Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Wong SC, McKnight SL. **Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2.** Immunity 1995; 2: 321-9.
  47. Gilmour KC, Pine R, Reich NC. **Interleukin 2 activates STAT5 transcription factor (mammary gland factor) and specific gene expression in T lymphocytes.** Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 10772-6.
  48. Wang LH, Kirken RA, Erwin RA, Yu CR, Farrar WL. **JAK3, STAT, and MAPK signaling pathways as novel molecular targets for the tyrophostin AG-490 regulation of IL-2-mediated T cell response.** J Immunol 1999; 162: 3897-904.
  49. Baškiewicz-Masiuk M, Machaliński B. **The role of the STAT5 proteins in the proliferation and apoptosis of the CML and AML cells.** Eur J Haematol 2004; 72: 420-9.
  50. Hoelbl A, Schuster C, Kovacic B, Zhu B, Wickre M, Hoelzl MA, et al. **Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia.** EMBO Mol Med 2010; 2: 98-110.
  51. Gelkop S, Babichev Y, Isakov N. **T cell activation induces direct binding of the Crk adapter protein to the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (p85) via a complex mechanism involving the Cbl protein.** J Biol Chem 2001; 276: 36174-82.
  52. Gelkop S, Isakov N. **T cell activation stimulates the association of enzymatically active tyrosine-phosphorylated ZAP-70 with the Crk adapter proteins.** J Biol Chem 1999; 274: 21519-27.
  53. Kar B, Reichman CT, Singh S, O'Connor JP, Birge RB. **Proapoptotic function of the nuclear Crk II adaptor protein.** Biochemistry 2007; 46: 10828-40.
  54. Smith JJ, Richardson DA, Kopf J, Yoshida M, Hollingsworth RE, Kornbluth S. **Apoptotic regulation by the Crk adapter protein mediated by interactions with Wee1 and Crm1/exportin.** Mol Cell Biol 2002; 22: 1412-23.

55. Pierdominici M, Marziali M, Giovannetti A, Oliva A, Rosso R, Marino B, et al. **T cell receptor repertoire and function in patients with DiGeorge syndrome and velocardiofacial syndrome.** Clin Exp Immunol 2000; 121: 127-32.
56. Zemble R, Luning Prak E, McDonald K, McDonald-McGinn D, Zackai E, Sullivan K. **Secondary immunologic consequences in chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome).** Clin Immunol 2010; 136: 409-18.
57. Nolz JC, Nacusi LP, Segovis CM, Medeiros RB, Mitchell JS, Shimizu Y, et al. **The WAVE2 complex regulates T cell receptor signaling to integrins via Abl- and CrkL-C3G-mediated activation of Rap1.** J Cell Biol 2008; 182: 1231-44.