



Università degli Studi di Cagliari

## **DOTTORATO DI RICERCA**

**Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo**

Ciclo XXV

### **TITOLO TESI**

**Studio delle modificazioni post-traduzionali della proteina AIRE e dell'effetto sulla sua attività trascrizionale, stabilità e localizzazione cellulare.**

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza

BIO/11

Presentata da	Dott.ssa Maria Luisa Serra
Coordinatore Dottorato	Prof. Paolo Moi
Tutor/Relatore	Prof.ssa Maria Cristina Rosatelli

Esame finale anno accademico 2011 – 2012



## INDICE

<b>Sommario</b>	<b>pag. 4</b>
<b>Introduzione</b>	<b>pag. 6</b>
<b>Obiettivo dello studio</b>	<b>pag. 44</b>
<b>Materiali e metodi</b>	<b>pag. 45</b>
<b>Risultati</b>	<b>pag. 63</b>
<b>Discussione</b>	<b>pag. 88</b>
<b>Conclusioni e prospettive future</b>	<b>pag. 92</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>pag. 95</b>

## Sommario

La ricerca sulle modificazioni post-traduzionali si è rivelata negli ultimi anni di grande interesse e i recenti sviluppi della spettrometria di massa hanno contribuito ad aumentare notevolmente i metodi d'indagine e le conoscenze in questo campo.

In particolare l'acetilazione delle lisine è stata individuata oltre che a livello istonico anche in un ampio numero di proteine non istoniche, dai regolatori trascrizionali, alle proteine citosoliche, agli enzimi mitocondriali, alle proteine associate alla membrana.

Gli studi condotti in questo lavoro si sono focalizzati sulla acetilazione e deacetilazione della proteina AIRE.

Mutazioni del gene AIRE (AutoImmune REgulator) sono causative della poliendocrinopatia autoimmune di tipo I (APS o APECED), una rara patologia autoimmune con trasmissione autosomica recessiva. La patologia è caratterizzata dall'insorgenza di manifestazioni autoimmuni organo-specifiche, in genere dirette contro il sistema endocrino. La presenza di due dei tre sintomi clinici principali ipoparatiroidismo, iposurrenalismo e candidiasi cronica mucocutanea, o di un solo sintomo in presenza di un fratello affetto permette la diagnosi clinica della malattia. L'indagine molecolare sul gene AIRE e l'identificazione di mutazioni in omozigosi o in doppia eterozigosi porta alla conferma della diagnosi clinica.

La malattia ha una bassa incidenza nella popolazione generale ma risulta avere una incidenza maggiore in alcune popolazioni geneticamente omogenee, come i finlandesi, gli ebrei askenazi e i sardi.

Come indica il nome, il gene è implicato nello sviluppo e nel mantenimento della tolleranza immunologica verso il self. Numerosi studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato la funzione di

AIRE come regolatore trascrizionale che controlla l'espressione ectopica degli antigeni self del timo. Tuttavia i meccanismi di questa regolazione sono ancora poco conosciuti.

Gli studi sull'acetilazione di AIRE e il suo coinvolgimento nel complesso corepressorio con attività deacetilasica contribuiscono ad ampliare le nostre conoscenze sui pathways in cui AIRE è coinvolta e sui meccanismi che regolano la tolleranza centrale.

## Introduzione

### La proteina AIRE e l'APECED

La proteina AIRE è un fattore di trascrizione espresso principalmente a livello delle cellule medullari epiteliali del timo. La sua funzione è quella di regolare l'espressione ectopica dei geni che codificano per antigeni periferici tessuto specifici, che saranno presentati ai timociti. Qualora si manifesti una reazione tra questi e gli antigeni presentati verrà indotta la selezione negativa e i timociti reattivi contro gli auto antigeni verranno eliminati. Mutazioni del gene AIRE sono responsabili della poliendocrinopatia autoimmune di tipo I (APECED).

L'APECED (OMIM 240300) appartiene ad un gruppo di malattie chiamate sindromi autoimmuni poliendocrine (APS). Nonostante l'eterogeneità di questo gruppo di sindromi, esse presentano delle caratteristiche comuni, poiché i pazienti soffrono di diverse manifestazioni autoimmuni organo-specifiche che colpiscono in genere gli organi endocrini. APECED significa **A**utoimmune **P**olyEndocrinopathy **C**andidiasis **E**ctodermal **D**ystrophy e riflette le caratteristiche cliniche dei soggetti affetti (Neufeld et al., 1980; Perheentupa, 1980; Neufeld et al., 1981).

Generalmente le patologie autoimmuni sono causate da effetti combinatori di più geni e fattori ambientali. Sono poche invece quelle monogeniche descritte e includono oltre all'APECED, IPEX, ALPS, IL-2R $\alpha$  deficiency. (Ulmanen et al. 2005 ).

L'APECED presenta una bassa incidenza nella popolazione generale ma risulta relativamente frequente in popolazioni geneticamente isolate come i finlandesi (1 : 25000) (Bjorses P et al., 1996), gli ebrei iraniani (1 : 9000) (Zlotogora J et al., 1992) e i sardi (1:14400) (Rosatelli MC et al., 1998). La diagnosi della malattia risulta tuttora difficile per cui molti casi non vengono correttamente diagnosticati e di conseguenza l'incidenza reale della malattia potrebbe essere sottostimata.

L'APECED è trasmessa con ereditarietà di tipo autosomico recessivo ed insorge nella prima infanzia o in età pediatrica. I tre sintomi principali sono la candidiasi cronica mucocutanea, l'insufficienza surrenalica e l'ipoparatiroidismo. Questi sintomi insorgono generalmente nell'ordine specifico con cui sono stati nominati, sebbene sia le componenti cliniche che il decorso della malattia siano notevolmente variabili tra le diverse popolazioni. Il quadro clinico risulta spesso aggravato da altri disturbi endocrini -come insufficienza gonadica, diabete di tipo I, tiroidite, ipofisite- e non endocrini come distrofia ungueale, aplasia dello smalto, cheratopatia, alopecia, vitiligine, atrofia gastrica cronica, epatite e disfunzioni intestinali. L'ipoparatiroidismo si manifesta nei primi dieci anni di vita e costituisce talvolta l'unico sintomo autoimmune dei pazienti APECED; infatti nella maggior parte degli ebrei iraniani e in circa il 20% dei finlandesi l'ipoparatiroidismo rappresenta la sola endocrinopatia (Perheentupa, 2002). L'ipoparatiroidismo è seguito spesso da insufficienza surrenalica ed ha un'età di insorgenza che varia tra i 4 e i 12 anni (Pearce et al., 2001), anche se in molti casi può insorgere oltre i 20 anni di età. La candidiasi cronica mucocutanea appare subito dopo la nascita o entro i primi due anni di vita e si manifesta generalmente nel cavo orale.

Il primo autoanticorpo riconosciuto essere associato alla malattia è stato il citocromo P450 c17 (Krohn K et al., 1992); successivamente sono stati identificati altri due enzimi legati alla

sintesi degli ormoni steroidei: il P450 scc ed il P450 c21. Il primo di questi tre enzimi, che appartengono alla superfamiglia dei citocromi P450, è specifico per le ghiandole surrenali; gli altri due enzimi sono espressi oltre che nelle ghiandole surrenali, anche nelle gonadi e sono associati a insufficienza gonadica. È stato dimostrato che gli autoanticorpi P450 c17, P450 scc e P450 c21 inibiscono la sintesi degli ormoni steroidei in vitro (Furmaniak J et al., 1994).

Nell'APECED sono stati riscontrati molti altri autoanticorpi responsabili della distruzione degli organi target (Ahonen P. et al., 1987), (Betterle C. et al., 1998), (Betterle C. et al., 2002).

In alcuni casi la presenza degli autoanticorpi può precedere la manifestazione clinica alla quale sono associati (Meager A. et al., 2006), (Wolff A. et al., 2007). Nella tabella B sono riportate le manifestazioni cliniche dell'APECED e gli specifici autoanticorpi associati.

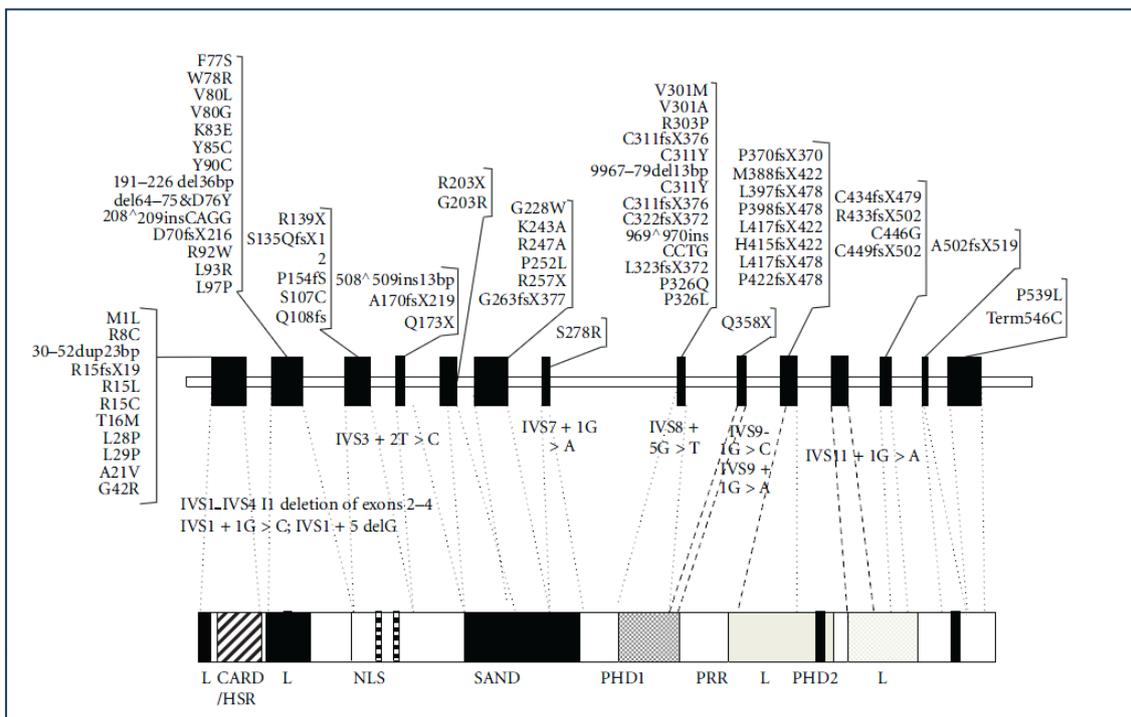
Clinical manifestation	Autoantibody specificities	Usual age at onset
<b>Classic triad</b>		
(i) Candidiasis	IL-17F, IL-22 [9]	Childhood
(ii) Hypoparathyroidism	NALP5, CaSR [13–15]	Childhood
(iii) Adrenal failure	P450c17, P450c21, P450scc [4, 37, 42, 83]	Childhood and adolescence
<b>Other endocrine disorders</b>		
(i) Ovarian failure	P450scc and P450c17 [4]	Adolescence to adulthood
(ii) Testicular failure	TSGA10 [84]	Adolescence to adulthood
(iii) Diabetes mellitus	IA-2, GAD65 [4, 42, 43]	Adulthood
(iv) Hypothyroidism	TG, TPO [38, 43]	Childhood to adulthood
(v) Hypopituitarism	TDRD6 [41]	Adolescence to adulthood
<b>Ectodermal features</b>		
(i) Alopecia	TH, hair follicles [4, 85]	Childhood to adulthood
(ii) Vitiligo	Melanocyte, SOX9, SOX10, AADC [39]	Childhood to adulthood
(iii) Keratopathy	Unknown	Childhood and adolescence
(iv) Enamel dysplasia	Unknown	Childhood
(v) Rash with fever	Unknown	Childhood
<b>Gastrointestinal disorders</b>		
(i) Gastritis/pernicious anemia	H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase, IF [26, 43]	Childhood to adulthood
(ii) Severe obstipation	TPH, HDC [4, 23, 40]	Childhood to adulthood
(iii) Chronic diarrhea	TPH, HDC [4, 23, 40]	Childhood to adulthood
(iv) Immune Hepatitis	CYP1A2, CYP2A2, AADC, TPH, HDC [3, 4, 19–21]	Childhood
Lung manifestations	KCNRG [27]	Childhood to adulthood
Tubulointerstitial nephritis	Unknown	Childhood
Asplenia	Unknown	Childhood to adulthood

IL-17F: interleukin 17F, IL-22: interleukin 22, NALP5: NACHT leucine-rich-repeat protein 5, CaSR: calcium-sensing receptor, P450c17: Steroid 17- $\alpha$ -hydroxylase, P450c21: steroid 21-hydroxylase, P450scc: side-chain cleavage enzyme, TSGA10: testis-specific gene 10 protein, IA-2: islet antigen-2, GAD65: glutamic acid decarboxylase-65, Tg: thyroglobulin, TPO: thyroid peroxidase, TDRD6: tudor domain-containing protein 6, TH: tyrosine hydroxylase, AADC: aromatic l-amino acid decarboxylase, IF: intrinsic factor, TPH: tryptophan hydroxylase, HDC: histidine decarboxylase, CYP1A2: cytochrome P450 1A2, CYP2A2: cytochrome P450 2A2, KCNRG: potassium channel-regulating protein.

**TABELLA B:** Manifestazioni cliniche dell' APECED e relativi autoanticorpi associati (da Capalbo et al 2012).

La sindrome APECED è dovuta a difetti del gene AIRE che mappa sul cromosoma 21 in posizione q22.3 (Finnish-German APECED Consortium, 1997; Nagamine et al., 1997). Esso è costituito da 14 esoni che coprono un intervallo di circa 12 Kb del DNA genomico.

Sinora sono state caratterizzate più di 70 mutazioni distribuite sia nelle regioni codificanti del gene che nei siti di splicing (figura 5) (HGMD : <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>).



**Figura 5:** Mutazioni nel gene AIRE e loro localizzazione a livello dei domini funzionali della proteina (modificato da Meloni et al 2002)

Esaminando le popolazioni geograficamente isolate che presentano un prevalenza della malattia più alta rispetto alla popolazione generale, si può riscontrare un tipico effetto fondatore per alcune specifiche mutazioni del gene. Esempio di questo è la mutazione

R257X, la mutazione più diffusa tra i pazienti finlandesi. I pazienti risultano nel 77 % dei casi omozigoti per la mutazione e per il 17% dei casi eterozigoti composti (Perheentupa, 2006).

Inoltre la mutazione R257X è stata evidenziata nel 30% dei pazienti non finlandesi (Björnses et al, 2000), rappresentando quindi la mutazione più frequente nella popolazione europea (Scott et al ,1998). Essa è presente nel 75% degli alleli dei pazienti APECED del centro e dell'est Europa e nel 71% degli alleli polacchi (Cihakova et al., 2001;. Stolarski et al., 2006).

Un'altra mutazione frequente è una delezione di 13 paia di basi (c.967-979del13bp) localizzata sull'esone 8. Questa mutazione è presente nell' 82% degli irlandesi, nel 70% degli inglesi, nel 53% dei nord americani e nel 48% dei norvegesi, ma è stata anche evidenziata in molti pazienti APECED di altra origine geografica (Pearce et al., 1998) (Heino et al.,1999) (Björnses et al., 2000) (Dominguez et al, 2006).

La totalità dei pazienti ebrei iraniani risulta essere omozigote per la mutazione Y85C. La presenza della mutazione Y85C non è rilevata in pazienti di altra origine geografica (Björnses et al.,2000).

Nel nostro paese sono presenti ampie variazioni regionali infatti nel nord Italia le mutazioni più frequenti sono la R257X e la delezione di 13 bp. In Sardegna invece la mutazione R139X risulta essere la più frequente e rappresenta il 94% degli alleli mutati nei pazienti APECED.

Nella popolazione generale sarda la sua frequenza si attesta attorno al 1,7 %, fatta eccezione per la provincia dell'Ogliastra dove ha una frequenza del 3,4 % (Rosatelli MC, 1998 ).

In Puglia invece è la mutazione W78R a rappresentare il 56% degli alleli mutati (Meloni A. et al., 2002).

Sebbene non sia stata definita una stretta correlazione genotipo-fenotipo, alcuni studi eseguiti sulla popolazione finlandese hanno dimostrato una correlazione tra la presenza

della mutazione R257X e la presenza della candidosi cronica mucocutanea nei pazienti APECED. Inoltre i pazienti ebrei, i quali presentano esclusivamente la mutazione Y85C, non sono affetti da candida (Zlotogora J. and Shapiro MS. 1992).

Nei pazienti APECED si osserva una marcata eterogeneità riguardo la variabilità dei sintomi, gli organi colpiti e la severità della malattia. Questo fa presupporre che vi siano altri fattori genetici modificatori, oltre alle mutazioni del gene AIRE, che influenzano l'espressione clinica della sindrome. Tra questi possono modificare significativamente il fenotipo dei pazienti APECED i geni HLA di classe II in quanto è evidenziabile un'associazione positiva tra il morbo di Addison e l'allele HLA-DRB1\*03 e dell'Alopecia con l'allele HLA-DRB1\*04 mentre il diabete di tipo I risulta essere associato negativamente con l'allele HLA-DRB1\*15-DQBI\*0602 (Halonen M et al., 2002).

### **Domini funzionali della proteina AIRE**

Il gene AIRE codifica per una proteina omonima di 545 aminoacidi del peso molecolare di 58kDa. La proteina è costituita da numerosi domini tipici dei fattori di trascrizione responsabili di diverse funzioni: omodimerizzazione, legame al DNA, transattivazione, interazione proteina-proteina, importazione ed esportazione nucleare (Finnish-German APECED Consortium, 1997; Nagamine K. et al., 1997).

Tutti i domini predetti di AIRE sono conservati nel topo (Blechsmidt K. et al., 1999), (Mittaz L. et al., 1999). Sia la proteina AIRE endogena che quella espressa transientemente in cellule di mammifero si trova localizzata nel nucleo, dove si distribuisce sotto forma di corpi nucleari, i cosiddetti Nuclear Body (NB).

La porzione ammino terminale di AIRE contiene un dominio chiamato HSR (Homogeneously staining region), aminoacidi 1-100, nel quale risiedono la capacità della proteina di omodimerizzare e la capacità transattivante (Pitkanen J 2000). Attraverso studi di "computer modeling" ed analisi di omologia di sequenza, il dominio HSR è stato meglio caratterizzato e rinominato dominio CARD (CAspase Recruitment Domain). Il dominio CARD appartiene ad una classe di motivi proteici strutturali denominati Death Fold che mediano le interazioni proteina-proteina nel processo apoptotico. Il dominio HSR/CARD di AIRE media l'omodimerizzazione proteica. La fosforilazione sembrerebbe coinvolta in questo processo infatti AIRE omodimerizza spontaneamente in vitro dopo fosforilazione da parte di cAMP protein kinasi C o A dipendente (Kumar et al., 2001).

Numerose mutazioni sono state descritte nel dominio HSR/CARD della proteina AIRE e molte di queste aboliscono la capacità di omodimerizzazione, funzione estremamente importante per una corretta attività della proteina. Mutazioni missenso che causano l'APECED alterano la struttura dell'HSR/CARD domain e talvolta distruggono la capacità transattivante della proteina (Halonen et al., 2004, Meloni et al., 2005).

Nella porzione N-terminale di AIRE è presente inoltre un dominio NLS, sito responsabile della localizzazione nucleare di AIRE attraverso l'interazione con le  $\alpha$ -importine, proteine deputate al trasporto delle proteine nel nucleo (Pitkänen 2001), (Ilmarinen T, 2005).

Benché la proteina AIRE sia prevalentemente localizzata a livello nucleare, (Kumar PG, 2001) (Björnses P 1999) si osserva anche una localizzazione citoplasmatica in associazione ai filamenti intermedi e all' $\alpha$ -tubulina dei microtubuli (Heino et al.1999) (Rinderle C. et al., 1999). Poiché AIRE contiene inoltre nella sua struttura anche un segnale di esportazione

nucleare (NES) nel suo dominio HSR, si può ipotizzare che sia in grado di spostarsi tra i due compartimenti cellulari (Pitkänen et al., 2001).

Il dominio SAND (Sp100, Aire-1, NucP41/75 e DEAF-), è un dominio di legame al DNA tipico delle proteine coinvolte nella regolazione trascrizionale cromatino-mediata ed è localizzato nella proteina dall'aminoacido 189 al 290 (Gibson et al. 1998).

Il dominio SAND è stato inizialmente identificato come un dominio di legame al DNA nella proteina Sp100, ma la sua funzione è simile in tutte le proteine che lo contengono. La struttura tridimensionale del dominio SAND di Sp100 mostra che il dominio adotta una piega compatta, costituito da cinque  $\beta$ -foglietti e quattro  $\alpha$ -eliche. Un'analisi di distribuzione delle cariche elettrostatiche del dominio SAND mostra che la superficie delle  $\alpha$ -eliche è positiva ed è altamente conservata tra le specie. La presenza della carica positiva sulle superficie del dominio SAND è implicata nel legame con le cariche negative del DNA, mutazioni in questo dominio determinano di conseguenza una drastica riduzione della capacità di legare il DNA (Bottomley MJ, 2001).

AIRE contiene inoltre nella sua struttura due domini PHD (plant homeodomain type/ zinc finger) (aa 296-343 e aa 434-475), importanti nelle interazioni proteina-proteina e altamente conservati tra le specie (Bienz M 2006). Molte evidenze sperimentali sostengono che il PHD1 si lega preferenzialmente a residui non metilati H3K4, portando ad attivazione della trascrizione di geni trascrizionalmente inattivi. Mutazioni a livello del PHD1 fanno notevolmente diminuire la capacità transattivante della proteina (Org et al., 2008) (Bottomley MJ, 2005).

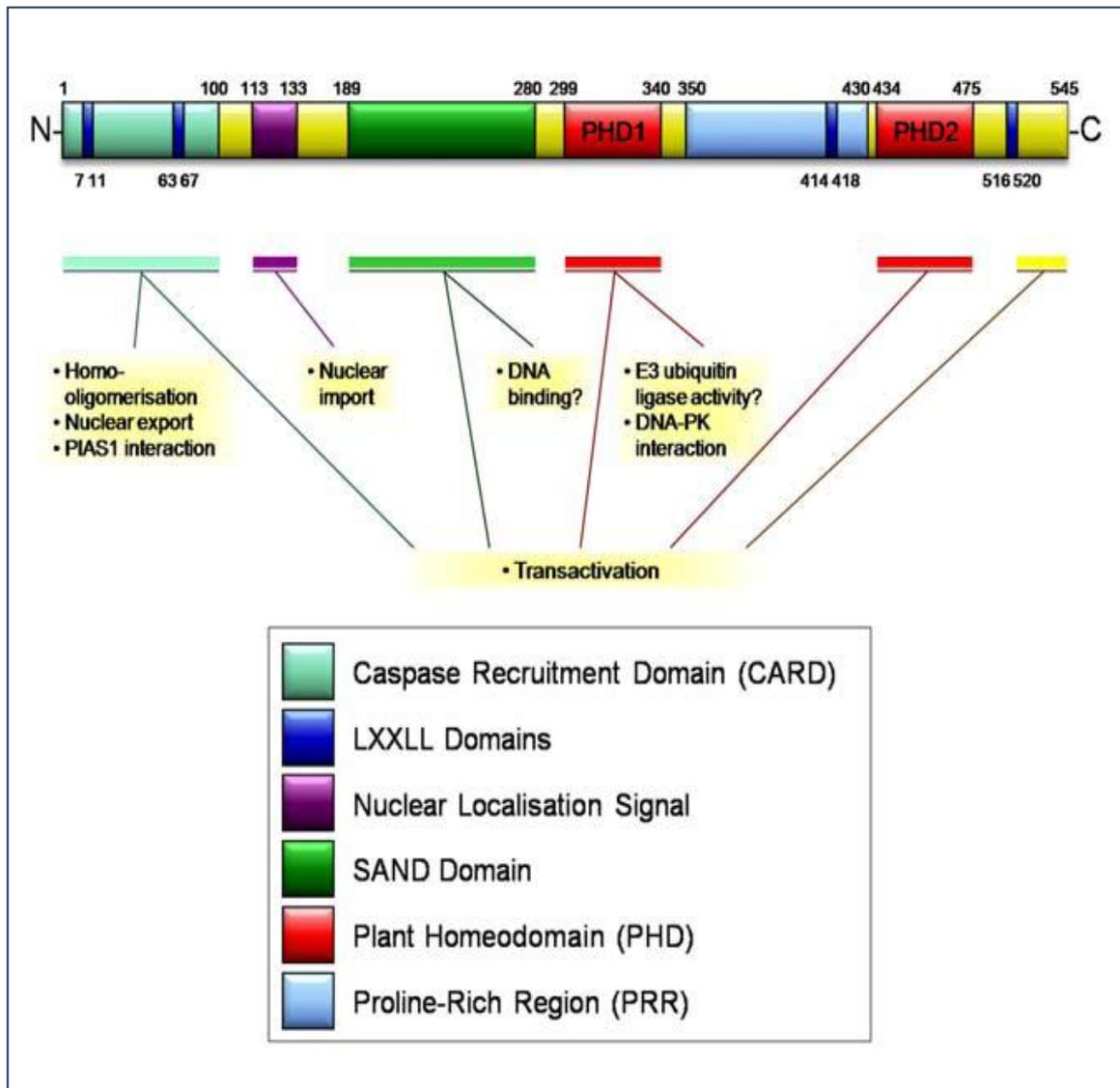
Alcuni autori propongono anche che il PHD1 possa mediare *in vitro* un'attività E3-ubiquitin-ligasica di AIRE ed è in grado di reprimere la trascrizione di alcuni geni che sono partner di CBP (Uchida *et al.* 2004).

Recenti studi dimostrano che il PHD2 di AIRE ha un ruolo importante a livello delle cellule MEC del timo, dove AIRE regola l'espressione di geni importanti per lo sviluppo della tolleranza immunologica (Sun J, 2012).

La proteina AIRE oltre a questi domini possiede anche un motivo leucine zipper vicino al primo PHD (aminoacidi a391-341). I motivi leucine zipper caratterizzano la maggior parte dei regolatori trascrizionali degli eucarioti. Alcuni autori propongono come funzione specifica dei leucine zipper di AIRE quella di essere responsabili dell'omodimerizzazione (Kumar 2001).

Sono inoltre presenti nella struttura quattro LXXLL motif (aminoacidi da 7 a 11, da 63 a 67, da 414 a 418, da 516 a 520), fiancheggiati da sequenze ricche in prolina. Le sequenze prolin rich sono presenti anche in altri fattori di trascrizione e mediano l'interazione proteina-proteina. I motivi LXXLL sono sequenze anfipatiche presenti in un alto numero di proteine, è stato dimostrato che la loro presenza è necessaria e sufficiente per mediare il legame con recettori nucleari (David M 1997). Gli LXXLL motif di AIRE rappresentano inoltre domini di transattivazione della proteina (Meloni A et al 2008).

In figura 6 è mostrata una schematizzazione del ruolo dei differenti domini della proteina.



**Figura 6:** Rappresentazione dei domini funzionali della proteina AIRE e del loro ruolo funzionale (adattata da Su and Anderson 2004; Peterson et al. 2008).

## **Localizzazione subcellulare e ruolo della proteina AIRE nella regolazione della trascrizione**

Sia nell'uomo che nel topo la proteina AIRE è localizzata nel nucleo in strutture dette nuclear bodies (NBs) come rivelano studi di microscopia ad immunofluorescenza. Questo pattern di distribuzione nucleare è stato riscontrato anche nei monociti del sangue periferico (Bjorses P et al., 1999, Heino M et al., 1999, Bjorses P et al., 2000). Tale struttura nucleare presente sottoforma di aggregati è simile ai PML (Promyelocytic Leukaemia); i nuclear bodies (NBs), noti anche come ND10, rappresentano un esempio delle più studiate strutture subnucleari. L'integrità di tali strutture è alterata in alcune gravi patologie e la loro disgregazione (talvolta reversibile) è associata alla perdita del controllo trascrizionale di alcune proteine come p53, Lef-1, DAXX che costituiscono o sono strettamente associate con i ND10. La proteina AIRE non colocalizza con i PML ma potrebbe avere una funzione paragonabile nella regolazione dell'espressione di geni bersaglio singoli o raggruppati in cluster.

Per dimostrare la capacità di AIRE di transattivare i geni bersaglio sono stati utilizzati due modelli (Bjorses P et al., 2000, Pitkanen J et al., 2001) che hanno riportato gli stessi risultati: il primo prevede l'utilizzo della tecnica One Hybrid nella quale la proteina AIRE è espressa come proteina di fusione con il GAL 4 DNA Binding Domain ed il gene reporter è preceduto da un minimal promoter e da un GAL 4 Binding Site (Bjorses P et al., 2000); il secondo esperimento si basa sull'utilizzo di un minimal promoter del gene per il  $\beta$  interferone posizionato a monte del gene reporter della luciferasi. In entrambi gli esperimenti la proteina AIRE ha mostrato un'elevata capacità transattivante.

## **Espressione della proteina AIRE**

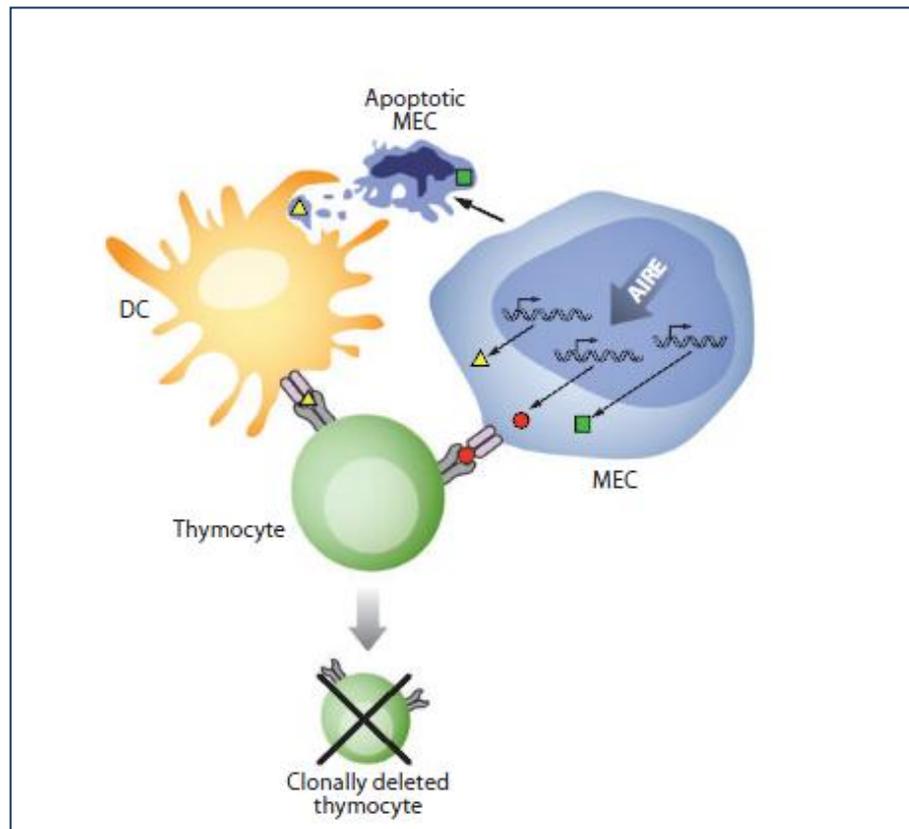
Nell'uomo la proteina AIRE è espressa principalmente nel timo, nella milza, nei linfonodi e nel fegato fetale (Finnish-German APECED Consortium 1997, Nagamine K et al., 1997, Bjores P et al., 1999). La sua espressione è riscontrabile anche nelle cellule della linea monocitodendritica (Kogawa K et al., 2002). A livello timico i più alti valori di espressione sono stati rilevati nelle cellule epiteliali della midollare chiamate MECs (o mTECs). Le MECs costituiscono una piccola ed eterogenea frazione di cellule stromali (Anderson G and Jenkinson EJ 2001) che hanno il ruolo di cellule presentanti l'antigene (APC) e che sono implicate nell'induzione della tolleranza di timociti maturi CD4+8- e CD4-8+ (Oukka M et al., 1996, 1996b; Kishimoto H and Sprent J 1997; Kishimoto H et al., 1996; Klein L et al., 1998). L'espressione di AIRE nelle cellule epiteliali timiche è stata dimostrata anche da ulteriori studi basati sulla quantificazione del trascritto del gene AIRE sui timociti, su cellule epiteliali e cellule dendritiche isolate da timo di topo. Tali studi hanno dimostrato che la proteina AIRE è espressa nelle MECs e nelle cellule dendritiche ma non nei linfociti (Zuklys S et al., 2000).

Nel topo l'espressione della proteina risulta essere più diffusa e comprende, oltre ad i tessuti menzionati per l'uomo, anche il midollo, il tratto urogenitale, il tratto respiratorio, il tratto alimentare, il cervello, le ghiandole surrenali e la tiroide (Blehschmidt K et al., 1999; Halonen H et al., 2001).

## **Ruolo di AIRE**

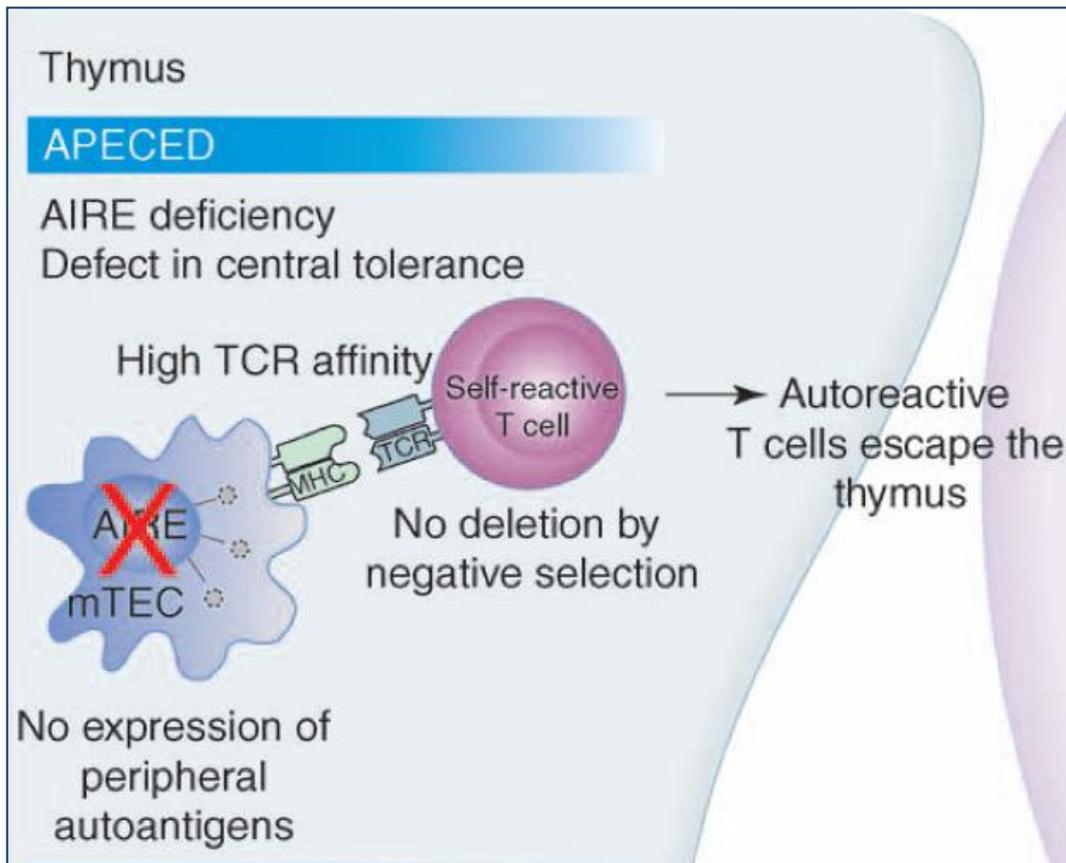
Diversi autori dimostrano che AIRE regola la trascrizione ectopica di numerosi geni che codificano per i TSA (antigene tessuto specifici) nelle mTECs del timo, in un processo chiamato espressione degli antigeni promiscui (Klein and Kyewshi 2000) (Anderson et al. 2002). Uno studio dimostra che AIRE lega direttamente il DNA e i promotori di alcuni geni TSA, regolando la loro espressione a livello timico (Ruan QG, 2007). Non tutti questi geni sono stati caratterizzati ma tra questi sono presenti modificatori post-traduzionali, fattori di trascrizione e di crescita, alcuni dei quali coinvolti in pathway immunogenetici rilevanti, e geni che codificano per proteine che sono conosciute come target di autoanticorpi.

La figura 7 mostra una schematizzazione del ruolo di AIRE a livello timico. La sua presenza fa sì che vengano espressi numerosi antigeni specifici, che saranno presentati ai timociti. Qualora si manifesti una reazione tra questi e gli antigeni presentati verrà indotta la selezione negativa e i timociti reattivi contro gli auto antigeni verranno eliminati.



**Figura 7:** Meccanismo funzionale proposto per la proteina *AIRE* (Da Mathis D. and Benoist C. *Ann. Rev. Immunol.* 2009).

AIRE ha inoltre anche un ruolo nel determinare il corretto sviluppo dell'architettura timica, importante per la selezione corretta delle cellule T. Il modello murino *Aire*<sup>-/-</sup> conferma che l'assenza di AIRE causa un difetto nell'espressione timica degli antigeni ectopici con conseguente perdita di tolleranza di questi antigeni e lo sviluppo dell'autoimmunità nei pazienti APECED (Figura 8).



**Figura 8:** *Meccanismo proposto in assenza di AIRE: gli antigeni-self non vengono espressi nel timo e le cellule T autoreattive non sono eliminate e sfuggono dal timo (da Ulmanen et al. Current Opinion in Immunology 2005).*

AIRE inoltre risulta diversamente espressa durante la selezione positiva e negativa. In topi mancanti di AIRE lo stroma timico è intatto (Anderson et al. 2002, Kuroda 2005), ma si notano alterazioni nell'epitelio midollare. Queste alterazioni causano dei cambiamenti nello sviluppo timico suggerendo un ruolo di AIRE nella differenziazione delle mTECs e/o nella loro sopravvivenza.

È indubbio l'importante ruolo di AIRE a livello centrale, tuttavia la proteina è espressa anche a livello periferico, soprattutto a livello dei linfonodi (Kazuhiko Kogawa, 2002). Diversi gruppi

di ricerca hanno indagato sull'eventuale ruolo di AIRE nel mantenimento della tolleranza periferica; questo si eserciterebbe tramite un controllo delle cellule T autoreattive sfuggite alla selezione negativa timica. Gli studi sono principalmente stati condotti sul modello murino ed hanno evidenziato un livello di espressione di AIRE nelle cellule dendritiche periferiche molto basso se paragonato a quello che si riscontra a livello timico.

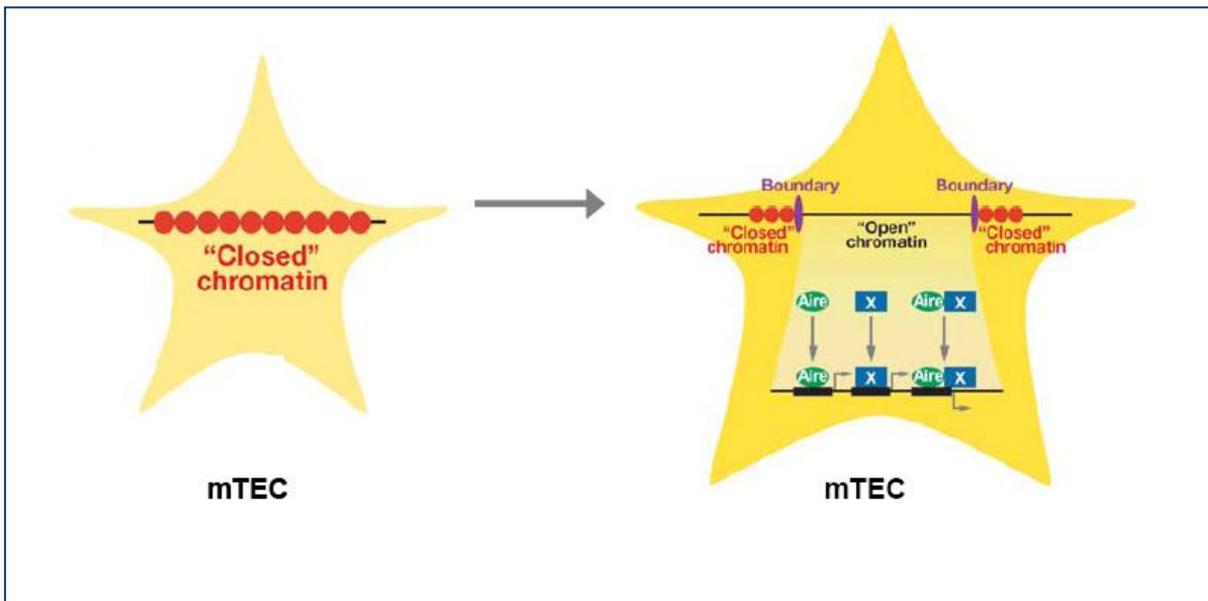
Sono state inoltre identificate nei linfonodi periferici delle cellule deputate alla delezione dei timociti autoreattivi che esprimono AIRE (Lee JW, 2007). I geni controllati da AIRE in queste cellule sono però solamente un decimo di quelli controllati a livello timico. Questi dati indicano che non vi sia ancora piena chiarezza sul ruolo di AIRE in periferia, tuttavia considerando quanto la tolleranza periferica giochi un ruolo importante nel controllo dell'autoimmunità, ulteriori studi potrebbero aiutare a comprendere meglio i meccanismi alla base di questi processi (Suzuki E., 2008.).

Il preciso meccanismo con cui AIRE promuove l'espressione genica ectopica non è ancora del tutto chiaro ma vari studi sembrano dimostrare che AIRE agisce con un meccanismo d'azione dipendente dal contesto cellulare nel quale si trova: sarà il contesto cellulare a determinare quali geni siano più suscettibili alla promozione trascrizionale di AIRE. Il meccanismo d'azione proposto non è quindi quello convenzionale degli altri fattori di trascrizione che agiscono a livello di elementi enhancer o dei promotori, ma prevede meccanismi di modificazione della cromatina.

È noto che AIRE attraverso il suo dominio PHD 1 è in grado di legare la lisina K4 non metilata dell'istone H3 (H3K4me0), modificazione associata con la cromatina inattiva. A livello dei promotori dei geni target AIRE è in grado di incrementare le modificazioni istoniche

associate con la cromatina attiva (H3K4me3 e AcH3). Quando la cromatina è in uno stato attivo, AIRE e altri fattori trascrizionali possono attivare l'espressione dei loro geni target.

L'attivazione dei geni avviene con differenti pattern di espressione nelle varie mTECs, che dipende dal rapporto stechiometrico con i vari fattori trascrizionali di ciascuna cellula (Figura 9).



**Figura 9:** Meccanismo epigenetico proposto per AIRE nelle mTEC (Modificato da Sinemius A.2010).

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

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

AIRE entra nel nucleo attraverso l'interazione con le importine e si localizza preferenzialmente in regioni della cromatina inattiva, attraverso il suo legame con la lisina K4 dell'istone H3. All'interno di questa regione interagisce con una topoisomerasi, TOP 2,

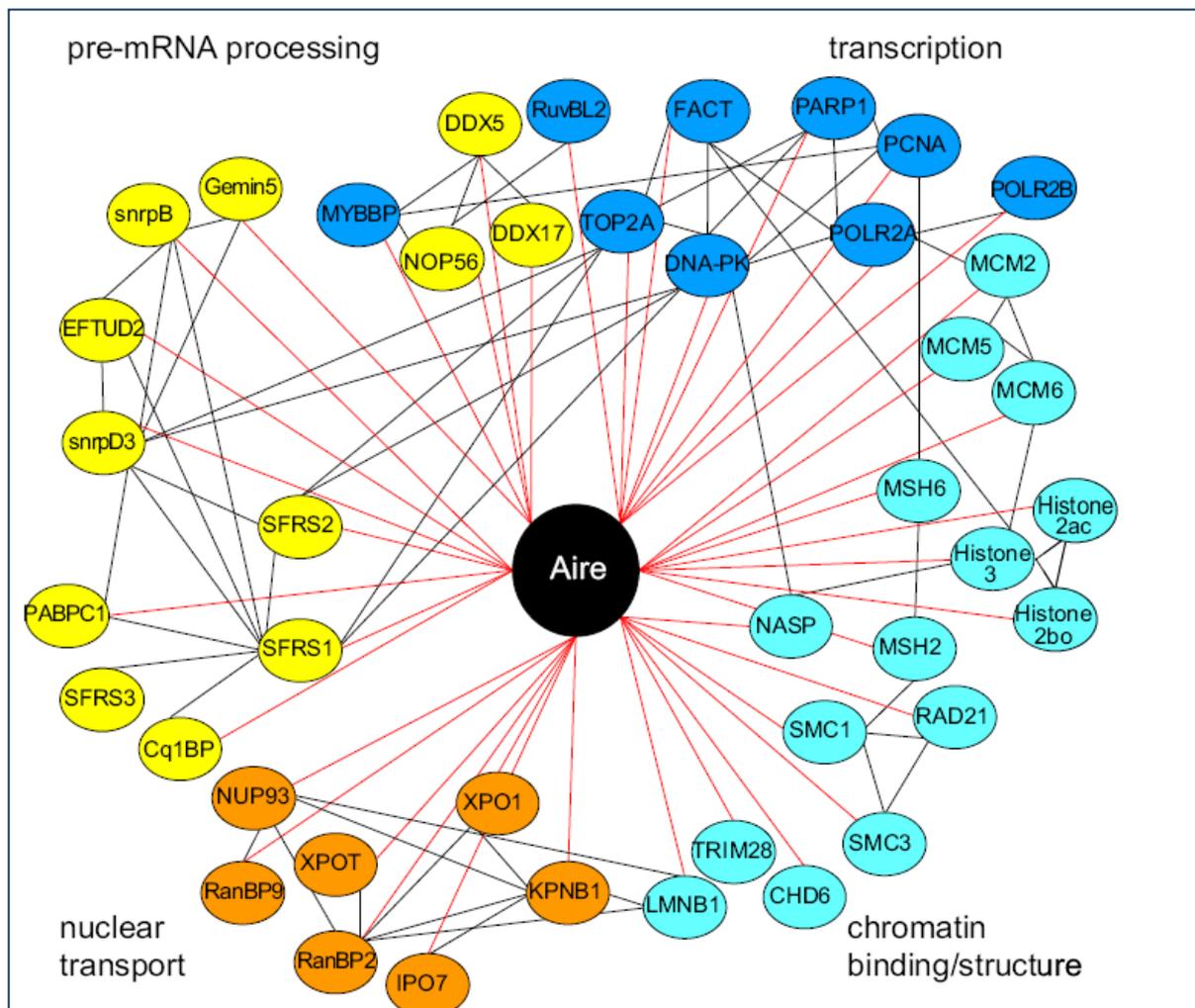
promuovendo la risoluzione dei “double-stranded breaks” e favorendo così il legame di DNA-PK ad altri complessi di rimodellamento cromatinico.

### **Partners di AIRE**

Numerosi dati in letteratura dimostrano che AIRE ha principalmente un ruolo di attivatore trascrizionale (Mathis e Benoist, 2009). La sua struttura costituita da domini tipici dei fattori di trascrizione e la sua localizzazione prevalentemente nucleare rendono possibile l'interazione con altre diverse proteine, portando alla formazione di complessi proteici che modulano l'attività di numerosi geni bersaglio (Ferguson BJ, et al., 2008).

Recentemente sono state evidenziate numerose proteine in grado di interagire direttamente o indirettamente con AIRE (Abramson J. et al., 2010 ). Le proteine identificate sono state suddivise in quattro categorie: proteine di trasporto nucleare, proteine che legano la cromatina, proteine coinvolte rispettivamente nella trascrizione e nel processamento dell'RNA (Figura 10).

Questo dato propone una panoramica dei numerosi e differenti processi che vedono implicata AIRE, alcuni dei quali ad oggi non risultano ancora completamente chiariti.



**Figura 10** : Rete molecolare dei vari partner di AIRE (Abramson J. et al., Cell 2010).

Alcuni tra i partner di AIRE hanno attività acetilasi o deacetilasi, mediando cioè l'aggiunta o la rimozione dei gruppi acetili a livello dei residui di lisina. Tra questi vi sono CBP (CREB-binding protein) e p300, enzimi con nota attività acetilasi, e alcuni enzimi con attività deacetilasi della famiglia degli HDACs :

-**CBP** (CREB-binding protein) è un attivatore trascrizionale ubiquitario ed è stato il primo partner di AIRE ad essere stato identificato (Pitkanen et al. 2000). CBP regola la trascrizione

attraverso l'acetilazione e deacetilazione degli istoni. Esso interagisce con AIRE a livello dei nuclear bodies e questa interazione aumenta l'espressione dei suoi geni target (Pitkanen et al. 2005). La formazione del complesso CBP-AIRE può favorire la migrazione di CBP dal citoplasma al nucleo, come è dimostrato da colture di cellule di timo mancanti di AIRE, dove CBP rimane localizzato a livello citoplasmatico. AIRE potrebbe facilitare l'importazione di CBP nel nucleo e aumentare la sua ritenzione nelle mTECs.

**-p300.** La proteina p300, così come CBP, è un attivatore trascrizionale ubiquitario e gioca un ruolo chiave in numerosi processi cellulari (Yuan and Giordano, 2002). Principalmente la sua funzione è quella di istone acetiltransferasi (HAT), tuttavia la sua azione non è ristretta alle proteine istoniche, ma esplicata anche a livello di numerosi fattori di trascrizione (Boyes et al, 1998; Deng et al, 2000.; Imhof et al, 1997;. Naar et al, 1998.; Cress e Seto, 2000; Bannister e Kouzarides, 1996; Ogryzko et al, 1996).

La proteina AIRE si associa in vivo con il complesso p300/CBP, (Akiyoshi H, et al. 2004); recentemente Saare et al hanno dimostrato che questa interazione si traduce in un'acetilazione di AIRE su particolari lisine target. In particolare gli autori hanno focalizzato la loro attenzione sull'analisi del SAND domain, dimostrando che l'acetilazione di alcune lisine (K243-K253-K259) influenza la selezione dei geni bersaglio regolati da AIRE. Infatti, attraverso analisi dei profili di espressione, gli autori concludono che AIRE *wild type* è capace di upregolare circa 240 geni, diversi dai 190 che upregola quando è acetilata nelle lisine 243 e 253 (Saare et al 2012).

**-HDAC1 e 2.** Gli HDACs sono gli enzimi responsabili della rimozione di un gruppo acetile dai residui di lisina, con azione opposta a quella mediata dagli enzimi HAT. In un nostro precedente lavoro abbiamo dimostrato tramite esperimenti di immunoprecipitazione l'interazione fisica di AIRE con le proteine del complesso deacetilasico HDAC1 e HDAC2 (Meloni et al 2010).

Nel corso del medesimo studio abbiamo identificato come nuovo partner di AIRE la proteina **DAXX**. Questa proteina è espressa in maniera ubiquitaria poiché partecipa a numerosi processi cellulari, ma si osserva una sua particolare espressione a livello timico e testicolare (Yang X. et al., 1997).

Dal punto di vista funzionale DAXX è un co-repressore trascrizionale e svolge la sua funzione di repressione sui geni target interagendo a livello nucleare con numerosi altri fattori di trascrizione. È stato inoltre evidenziato che la proteina DAXX è in grado di interagire col complesso multi-proteico del quale fanno parte le deacetilasi istoniche (HDACs) (Hollenbach AD. et al.,1999).

Si può quindi ipotizzare che l'interazione tra AIRE e DAXX moduli la regolazione trascrizionale promossa da modificazioni epigenetiche della cromatina. Mentre l'azione di DAXX e degli HDACs porta ad una repressione trascrizionale, AIRE promuove l'espressione di geni che sono caratterizzati da bassi livelli di espressione. Potrebbe esistere quindi un complesso multiproteico che comprende AIRE, DAXX e gli HDACs la cui attività è finemente regolata in virtù delle specifiche necessità cellulari.

Considerando le recenti scoperte e le conoscenze che si stanno accumulando sulla proteina AIRE appare chiara l'importanza di studi funzionali indirizzati ai domini responsabili della sua attività. Considerando inoltre che le interazioni proteina-proteina, l'attività transattivante e

la localizzazione cellulare di alcuni fattori di trascrizione risultano influenzati dalle modificazioni post-traduzionali e in particolare dall'acetilazione, può risultare importante approfondire le conoscenze in questo campo anche per la proteina AIRE.

## **Modificazioni post traduzionali delle proteine**

In tutti gli organismi incluso l'uomo la regolazione biologica è importante per una adeguata risposta al continuo cambiamento dell'ambiente circostante. La regolazione avviene sia a livello cellulare che a livello molecolare. Un tipo di regolazione molecolare sono le modificazioni delle proteine attraverso l'aggiunta o la rimozione di gruppi chimici dalla loro catena aminoacidica. Queste sono conosciute come modificazioni post traduzionali (PTM).

Il numero delle proteine covalentemente modificate supera di molto il numero delle proteine che vengono predette dal solo DNA codificante. Infatti se si considerano tutte le modificazioni post-traduzionali si arriva a catalogare più di un milione di proteine che rende enormemente complesso il proteoma eucariotico. Le modificazioni post-traduzionali avvengono durante e dopo il processo di traduzione delle proteine.

La proteina nascente, che è comunque stabile in condizioni fisiologiche, è soggetta a numerose modificazioni covalenti specifiche che possono avvenire o all'interno della catena aminoacidica o all'estremità ammino-terminale. Queste modificazioni avvengono ad opera di un numeroso gruppo di enzimi (circa 1000) che rappresentano il 5% del genoma eucariotico (Walsh, 2005).

Le modificazioni post-traduzionali si possono dividere in due grandi categorie:

-modificazioni covalenti per aggiunta di un gruppo chimico, in genere un gruppo elettrofilo donato da un co-substrato sulla catena aminoacidica.

-tagli covalenti del peptide tramite l'azione di proteasi o tramite taglio autocatalitico. La proteolisi è importante nel controllo della localizzazione, dell'attività e dell'emivita di ogni proteina ed è una strategia centrale per la regolazione della composizione e funzione del proteoma.

Le addizioni covalenti comprendono differenti tipi di modificazioni tra cui la fosforilazione, la metilazione, l'ubiquitilazione e l'acetilazione.

### **Fosforilazione**

Nei mammiferi la fosforilazione è una modificazione a carico di tre aminoacidi, la serina, la treonina e la tirosina che in seguito a questa modificazione vengono trasformati in fosfo serina(pS), fosfotreonina (pT) e fosfotirosina (pY). Gli enzimi che regolano questa modificazione sono un gruppo molto numeroso di circa 500 protein kinasi e benché agiscano su circa 20 substrati proteici, possono portare alla formazione di circa 10000 distinte forme di proteine fosforilate. L'introduzione di un gruppo fosfato nella struttura proteica in sostituzione di un gruppo OH neutro induce un'alterazione conformazionale della proteina che porta ad una locale riorganizzazione del dominio proteico e si traduce infine in un'attivazione di una cascata enzimatica.

### **Metilazione**

La metilazione è una modificazione nella quale viene inserito il gruppo metile su residui di lisina o arginina. La metilazione in genere avviene sulle code istoniche che sono già acetilate. Un ulteriore livello di complessità è reso possibile dal fatto che le lisine ammino-terminali possono essere progressivamente metilate (mono-, di- e tri- metilate). Anche per i residui di arginina si osserva una mono o di-metilazione. Questo differente stato di metilazione ha un significato funzionale importante per il reclutamento di proteine coinvolte nel controllo trascrizionale.

### **Mono e poli-ubiquitinazione**

L'ubiquitinazione è una modificazione dovuta all'aggiunta di una molecola di ubiquitina a livello di un residuo di lisina. Affinché questa modificazione possa avvenire l'estremità carbossi-terminale della catena aminoacidica deve essere precedentemente attivata. L'attivazione della catena enzimatica coinvolge un enzima E1 che crea l'ubiquitin-AMP, un enzima E2 che contiene un gruppo tiolico e che crea il sito attivo per l'attacco nucleofilo dell'ubiquitina. È necessario poi l'intervento di un enzima E3 per catalizzare il trasferimento dell'ubiquitina attivata sulle lisine delle proteine target. Esistono negli eucarioti centinaia di enzimi E3 che consentono una sottile discriminazione tra le proteine target dell'ubiquitinazione. In base al numero di residui di ubiquitina aggiunti alla proteina si parla di mono o poli-ubiquitinazione, intendendo per poliubiquitinazione l'aggiunta di catene di ubiquitina.

Monoubiquitinazione e poliubiquitinazione portano a differenti destini cellulari. La monoubiquitinazione regola l'endocitosi e la rilocalizzazione negli endosomi delle proteine

della membrana plasmatica, la localizzazione sub-cellulare delle proteine, il riparo del DNA, l'attività degli istoni e l'attivazione trascrizionale. La poliubiquitilazione può regolare la riparazione del DNA o portare a degradazione proteica proteasoma dipendente.

L'aggiunta di una sola molecola di ubiquitina può portare ad esempio alla rilocalizzazione dei recettori di membrana. Questo avviene tramite l'attivazione di numerosi partner proteici che agiscono come chaperones molecolari e portano all'internalizzazione del recettore ubiquitinilato, alla sua importazione negli endosomi e al transito nei lisosomi dove avviene la degradazione proteolitica.

La poliubiquitilazione può invece inviare le proteine al proteasoma per la degradazione. Ad esempio il legame di 4 molecole di ubiquitina ad una lisina costituisce un segnale di reclutamento per le chaperonine, queste proteine accompagnano poi le proteine ubiquitilate al proteasoma, dove la catena di poliubiquitina è rimossa. La proteina all'interno del proteasoma viene quindi degradata da specifiche proteasi.

La più recente scoperta di molecole simili all'ubiquitina ha aperto un nuovo orizzonte sulla modificazioni post traduzionali delle proteine e sul loro effetto biologico. Una delle proteine più studiate e maggiormente caratterizzate della famiglia dell'ubiquitina è SUMO. Come l'ubiquitina anche SUMO viene legata all'estremità carbossi-terminale delle proteine attraverso i tre enzimi E1-E2-E3. Differentemente dal ruolo proteolitico svolto dall'ubiquitina, SUMO è in grado di regolare la localizzazione cellulare e l'attività della proteine alle quali viene coniugata.

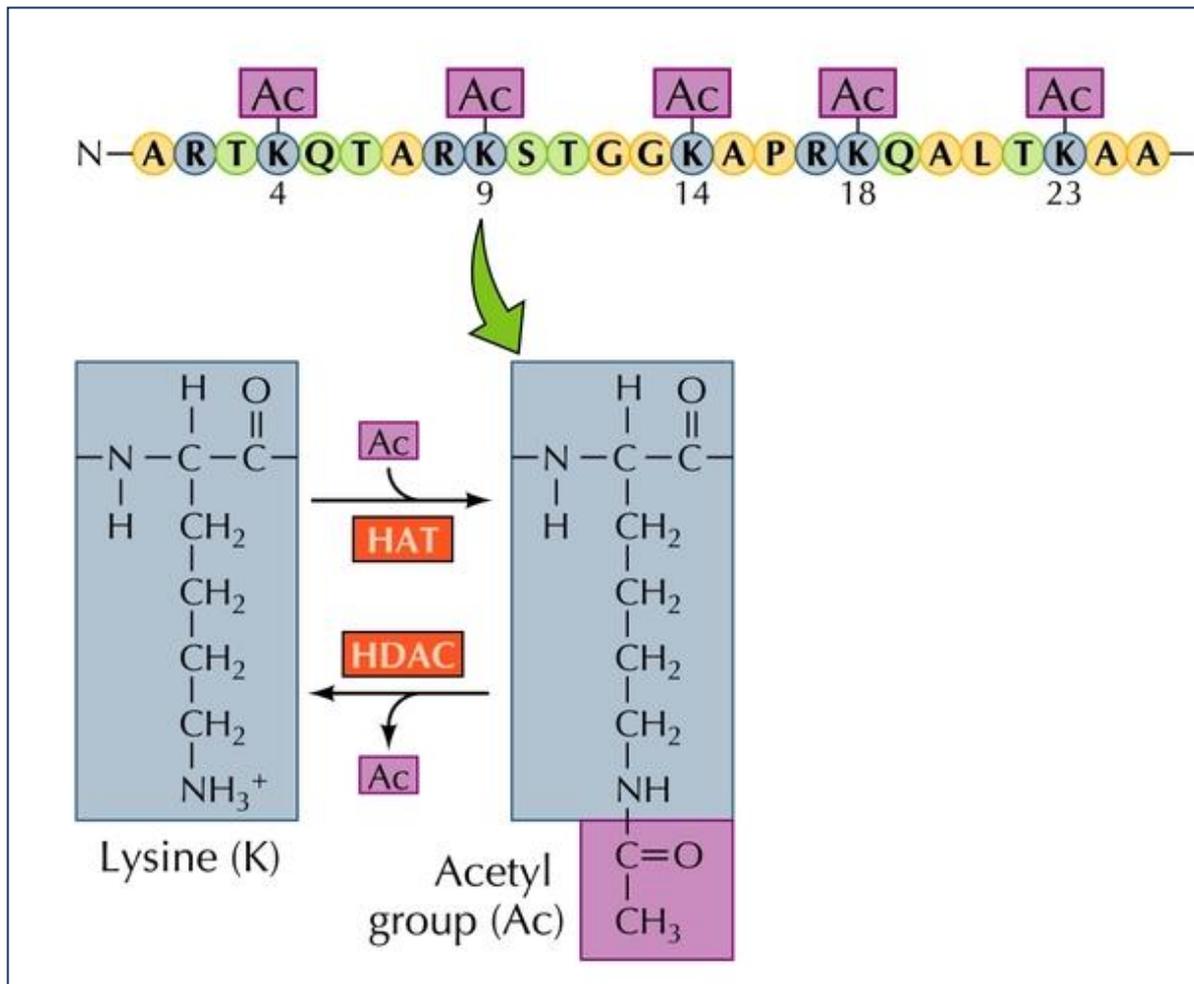
## **Acetilazione**

Tra le modificazioni post traduzionali l'acetilazione è stata una delle prime ad essere stata scoperta e studiata. Essa consiste nel trasferimento di un gruppo acetile, donato dall' acetil-coenzima A (acetil-CoA), sull' $\epsilon$ -ammino gruppo di un residuo di lisina, localizzato o all'interno della catena aminoacidica o all'estremità ammino-terminale, come nel caso delle code istoniche.

Dall'iniziale scoperta dell'acetilazione degli istoni che risale a circa 40 anni fa, recentemente sono state identificate numerose proteine non istoniche soggette a questa modificazione. L'acetilazione di queste proteine regola numerosi processi molecolari che le vedono coinvolte.

## **Significato funzionale dell'acetilazione**

Uno degli effetti regolatori dell'espressione genica più studiato è rappresentato dall'acetilazione degli istoni, processo legato a varie funzioni cellulari quali il riconoscimento del DNA da parte di proteine, le interazioni proteina-proteina e la stabilità proteica. Due famiglie d'enzimi, istone acetiltransferasi (HAT) e istone deacetilasi (HDAC), catalizzano le reazioni reversibili di acetilazione e deacetilazione a livello di residui lisinici di molecole istoniche e non istoniche (Figura 1).



**Figura 1:** Aggiunta o rimozione del gruppo acetile sui residui di lisina.

Gli enzimi istone acetiltransferasi (HAT) sono classificati in due principali gruppi HAT A e HAT B a seconda del loro meccanismo d'azione e della loro localizzazione cellulare. La tabella A indica la suddivisione in classi di questo numeroso gruppo di proteine.

Mammalian HATs					
Class	Subclass	Homology to yeast	Mammalian members	Mechanism of catalysis	Cell localization
A	GNAT-family	Gcn5	GCN5L PCAF	Transfer of acetyl group from acetyl-CoA to $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> group of histone N-tails after the assembly into nucleosomes	Nucleus
	MYST-family	Esa1; Sas2; Sas3	Tip60 HBO1 MORF MOZ CLOCK NCOAT MOF		
	Others	HAT1; Elp3; Hpa2; Nut1	p300/CBP TFIIIC complex ACTR/SRC-1 ATF-2		
B		Hat1	HAT1	Transfer of acetyl group from acetyl-CoA to $\epsilon$ -NH <sub>2</sub> group of free histones prior to their deposition on DNA	Cytoplasm

**Tabella A:** *Suddivisione degli enzimi HAT per classi di appartenenza.*

Un'altra classe di enzimi altamente conservati tra le specie, gli HDAC, catalizza la rimozione di un gruppo acetile dai residui di lisina, con azione opposta a quella mediata dagli HAT.

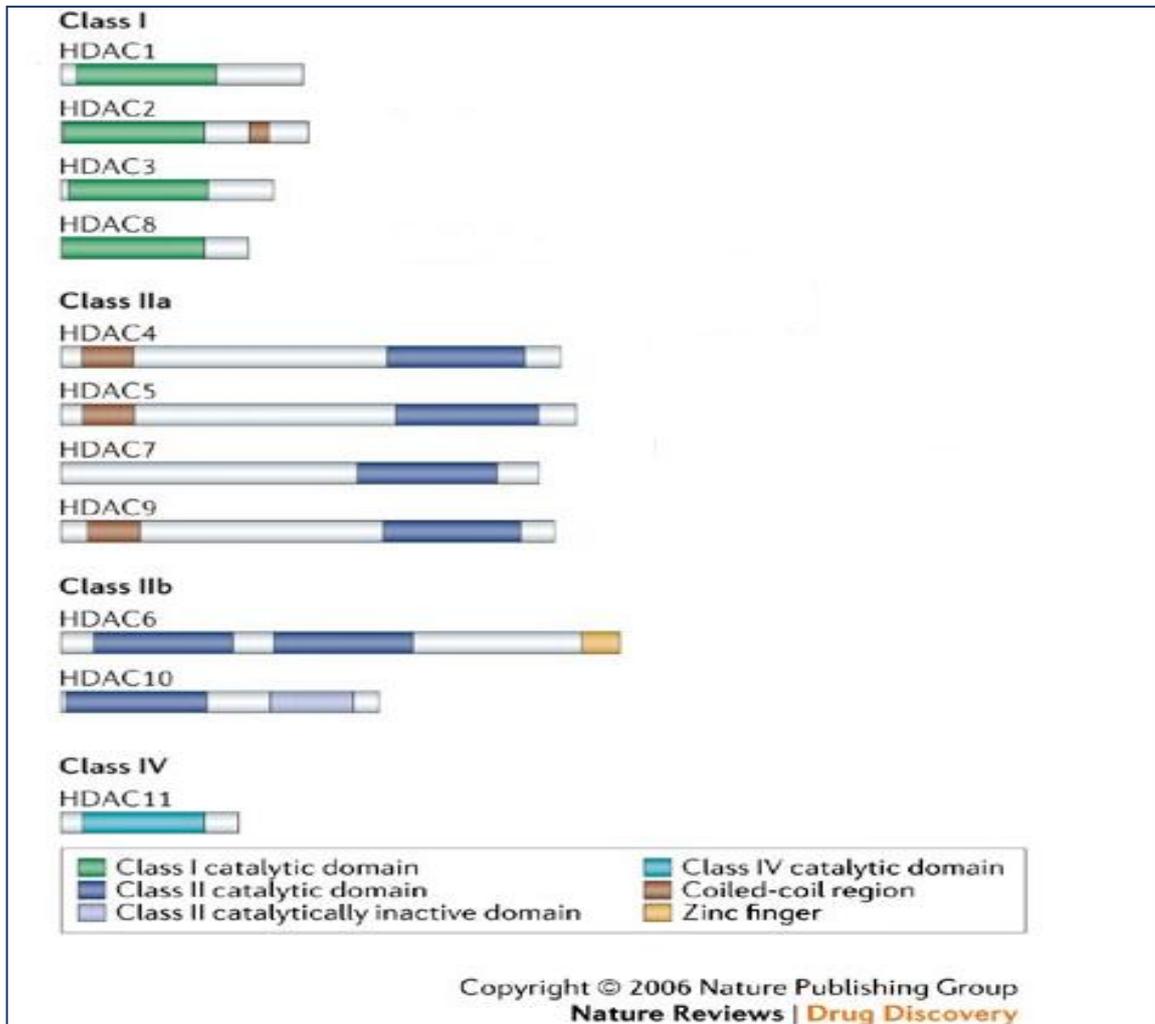
La famiglia degli enzimi HDAC mammiferi è costituita da 18 isoforme raggruppate in quattro principali classi secondo l'omologia di sequenza con le proteine del lievito (Figura 2) Tutti gli enzimi HDAC, ad eccezione della classe III, catalizzano la rimozione del gruppo fosfato con meccanismo zinco-dipendente.

Gli HDAC di classe I (HDAC 1, 2, 3, e 8), sono stati i primi ad essere identificati e sono omologhi alle proteina Rpd3 del lievito. Essi si localizzano prevalentemente nel nucleo.

La classe II si differenzia in classe IIa (HDAC 4, 5, 7, e 9) e classe IIb (HDAC 6 e 10), essi si trovano sia nel nucleo che nel citoplasma.

Gli enzimi di classe III, noti come sirtuine (SIRT1-7), sono dei regolatori trascrizionali NAD<sup>+</sup> dipendenti, differenziandosi dalle altre tre classi proprio per questa loro caratteristica.

La classe IV (che contiene solo HDAC 11) ha proprietà sia degli enzimi HDAC di classe I che di classe II.



**Figura 2 :** *Suddivisione degli enzimi HDAC per classi di appartenenza.*

Nelle cellule esiste un equilibrio tra le attività degli HAT e degli HDAC e ciò risulta in specifici profili cellulari d'espressione genica; al contrario, un' alterazione di tale equilibrio può essere associata allo sviluppo di varie patologie. Il silenziamento trascrizionale è associato alla ipoacetilazione istonica mediata dagli HDAC, mentre aree trascrizionalmente attive del

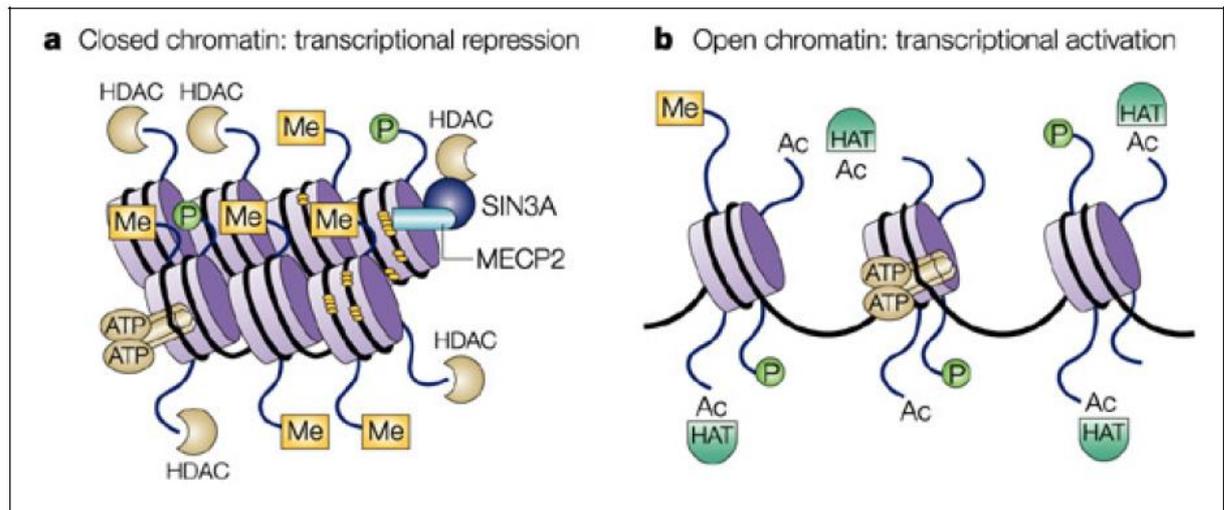
genoma sono associate a reazioni di acetilazione a livello dei gruppi  $\epsilon$ -amminici delle lisine delle code istoniche, catalizzate dagli enzimi HAT.

Il gruppo acetile è il principale metabolita dell'acetil-coenzima A, gli enzimi istone acetiltransferasi (HAT) determinano e regolano le differenti combinazioni con le quali i gruppi acetilici vengono aggiunti alle code istoniche.

All'estremità ammino terminale degli istoni vi sono in totale 15 lisine che sono possibili siti di acetilazione e le combinazioni di acetilazioni tra queste lisine sono innumerevoli. I gruppi acetilici delle lisine sono riconosciuti da alcuni fattori di trascrizione o proteine ad essi associate e il loro stato di acetilazione è in grado di regolare l'interazione con questi fattori di trascrizione che controllano l'inizio della trascrizione dei geni di quella regione di cromatina.

L'acetilazione degli istoni è infatti un processo legato all'attivazione trascrizionale, le code della proteine istoniche cariche positivamente interagiscono con i fosfati a carica negativa del DNA. L'aggiunta di un gruppo acetile sulla lisina cambia la carica di quest'ultima da positiva a neutra. Questa differente carica provoca una meno intensa interazione con le cariche negative del DNA permettendo ad alcuni fattori di trascrizione di legarsi ad esso.

Oltre all'acetilazione, anche la deacetilazione ha un ruolo importante nella regolazione dei fini meccanismi molecolari che sono alla base dell'espressione genica. La deacetilazione è la modificazione opposta all'acetilazione, che porta alla rimozione del gruppo acetile della lisina. Questa modificazione, mediata da specifici enzimi istone deacetilasi (HDAC), porta ad un ricompattamento cromatinico associabile con una minore attivazione trascrizionale (Figura 3) (Durrin et al. 1991).



**Figura 3:** *Variazione della struttura cromatinica in funzione dell'acetilazione (da Johnstone , 2002).*

Ci sono molteplici modificazioni che possono avvenire all'interno della stessa sequenza aminoacidica e in alcuni casi ci sono residui che possono essere modificati in più di un modo. Questa situazione è stata interpretata da alcuni autori come indicativa dell'esistenza di un codice combinatorio, il cosiddetto codice istonico, nel quale la combinazione di determinate modificazioni correlerebbe con un preciso effetto biologico (Fischle et al, 2003) (Strahl e Allis, 2000).

L'esistenza di questo codice è tuttavia controversa, anche se vi sono evidenze sperimentali a favore di questa ipotesi. Alcuni autori recentemente hanno dato minor peso all'importanza dell'acetilazione degli istoni sull'attivazione trascrizionale; l'acetilazione sarebbe invece importante come evento che influenza direttamente i processi di trascrizione, i meccanismi di riparazione del DNA e la replicazione o potrebbe essere integrata nel contesto di modificazioni globali della cromatina. Poiché l'acetilazione degli istoni modula direttamente la struttura della cromatina, è difficile discriminare tra acetilazione come segnale "codice"

per l'inizio della trascrizione e gli effetti diretti nei confronti della struttura cromatinica (Turner, 2007).

Le modificazioni istoniche rappresentano soltanto un esempio delle regolazioni svolte tramite l'acetilazione, questa modificazione post traduzionale infatti è coinvolta in diversi meccanismi di regolazione che agiscono a diversi livelli, dall'espressione genica fino alla modulazione dell'attività proteica, agiscono sulla modulazione dell'attività di fattori di trascrizione, sul processamento dell'mRNA e sulla regolazione della stabilità del trascritto, sulla regolazione della stabilità della proteina sia dipendente dal proteasoma che indipendente da esso, sulla modulazione dei regolatori del ciclo cellulare (Spange et al. 2009).

### **Acetilazione delle proteine non istoniche**

Recentemente l'analisi delle proteine acetilate (acetiloma) ha rivelato che l'acetilazione proteica sui residui di lisina è diffusa nelle proteine cellulari quanto la fosforilazione ed è quindi potenzialmente in grado di influire tanto profondamente quanto la fosforilazione sul metabolismo degli eucarioti. L'acetilazione proteica risulta quindi importante nella regolazione epigenetica (tramite l'acetilazione degli istoni), ma anche nella regolazione di un numero crescente di proteine non-istoniche che spesso giocano ruoli fondamentali nel metabolismo cellulare nonché nei processi associati a patologie importanti tra cui quelle neurodegenerative, oncologiche e cardiovascolari. Pertanto, la modulazione dell'acetilazione

proteica potrebbe risultare un meccanismo particolarmente interessante per lo sviluppo di agenti farmacologici, in virtù della sua importanza nella regolazione della fisiologia cellulare. Numerosi fattori di trascrizione sono stati identificati essere substrato di enzimi con attività acetil-transferasica in particolare di CREB-binding protein(CBP), del suo omologo p300 e di p300/CBP associated factor (pCAF). Tra questi fattori di trascrizione vi sono attivatori trascrizionale come E2F1-3 e c-Jun , coinvolti nella progressione del ciclo cellulare, p53, EKLF (Erythroid Krüppel-like Factor), fattore di trascrizione necessario per la maturazione delle cellule eritroidi, il fattore di trascrizione GATA-1 coinvolto nella differenziazione dei megacariociti ed eritociti, MyoD regolatore della differenziazione muscolare, il prodotto dell'oncoproteina c-myb, il recettore nucleare epatico HNF-4 (hepatocyte nuclear factor), fattori di trascrizione basali TFII-E- $\beta$  e TFII-F e ACTR, coattivatore del recettore nucleare degli ormoni steroidei, NFE2, fattore di trascrizione degli eritrociti. Oltre a quelli citati sono noti numerosi altri fattori di trascrizione soggetti all'acetilazione.

L'acetilazione può alterare la capacità dei fattori di trascrizione di legare il DNA come nel caso di p53, EKLF e GATA-1, oppure la loro capacità di interagire con altre proteine come nel caso di c-Jun ,ACTR, HNF4 e infine la loro localizzazione nucleare come nel caso di HNF4 (Polevoda,2002, Glozak,2005).

Inoltre pCAF, p300 e CBP sono in grado di auto-acetilarsi facilitando il riarrangiamento intramolecolare tra il bromo-domain (dominio che lega le lisine acetilate) e le lisine acetilate stesse; questa interazione potrebbe essere importante per l'attività acetiltransferasica e per il reclutamento del complesso di rimodellamento della cromatina.

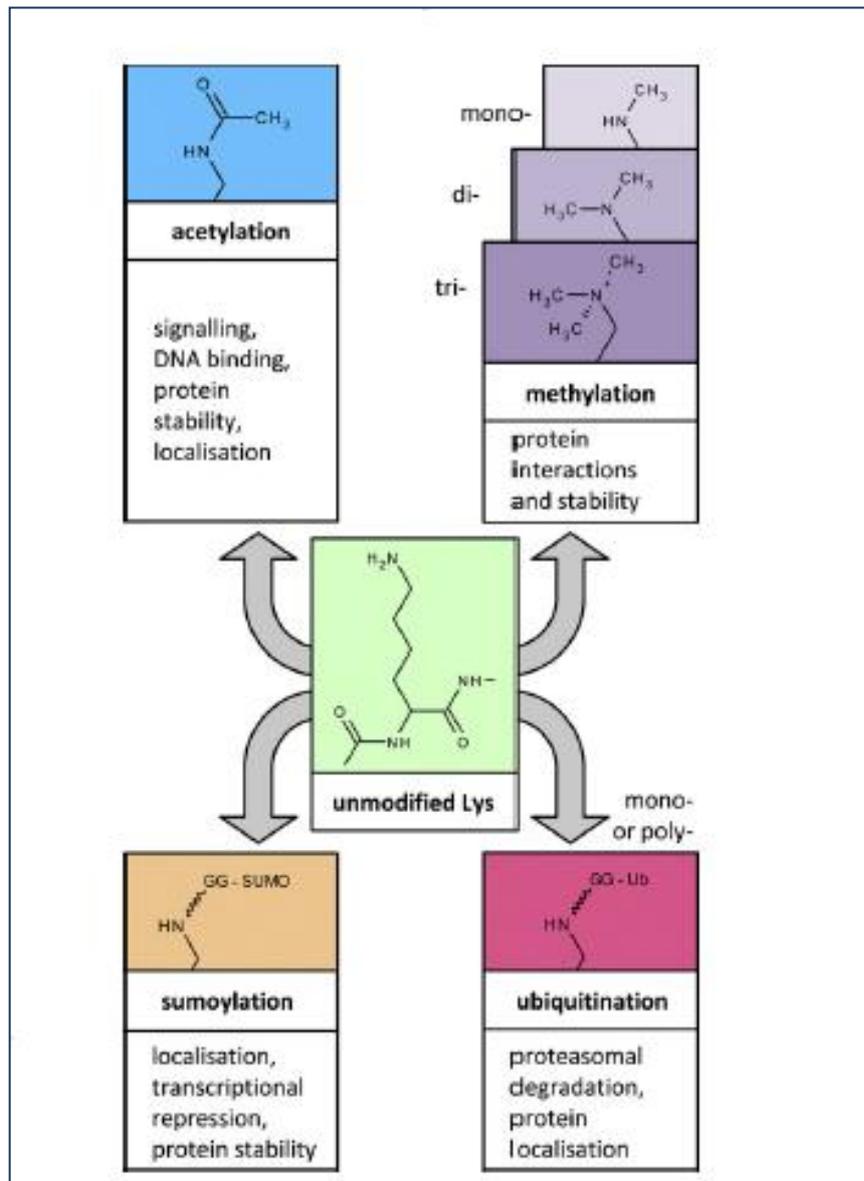
L'effetto dell'acetilazione sui fattori di trascrizione dipende anche dalla posizione della lisina acetilata all'interno della proteina; per esempio p53, EKLF e GATA-1 vengono acetilate in un

sito adiacente al DNA-binding domain e questo determina un aumento della loro capacità di legare il DNA e la conseguente attivazione dei geni target. In contrasto nel caso di HMGH(Y) l'acetilazione di un residuo di lisina all'interno del DNA-binding domain determina un cambio conformazionale e l'incapacità della proteina di legare il DNA.

Non sempre l'acetilazione dei fattori di trascrizione modifica la loro attività trascrizionale, può anche modificare le interazioni proteina-proteina, ad esempio il legame del recettore dell'ormone steroideo al suo coattivatore ACTR è inibito dall'acetilazione.

Inoltre l'acetilazione può stabilizzare le proteine aumentandone l'emivita come nel caso del fattore di trascrizione E2F1 oppure regolarne la localizzazione nucleare e citoplasmatica, come per la proteina c-Alb (Di Bari 2006).

Anche altre modificazioni post-traduzionali oltre l'acetilazione hanno come bersaglio i residui di lisina, la sostituzione di una modificazione con un'altra permette l'adattamento funzionale delle proteine nella cellula. Le catene laterali di lisina possono essere sia acetilate, ma anche metilate (mono-, di- o tri-metilate), ubiquitilate (mono- o poliubiquitilazione), sumoilate e ADP-ribosilate, come mostrato in figura 4.



**Figura 4:** Modificazioni a carico delle lisine (da Stephanie Spangea et al. 2009).

L'acetilazione può regolare la stabilità della proteina in modo sofisticato e con diversi meccanismi. L'acetilazione delle lisine può ad esempio competere con l'ubiquitilazione che avviene a livello dello stesso residuo aminoacidico. L'ubiquitilazione è una modificazione post-traduzionale che determina la degradazione proteica proteasoma mediata. L'acetilazione può quindi impedire l'ubiquitilazione e di conseguenza la degradazione della

proteina. Un esempio di questa regolazione è dato dalla proteina p53, la cui ubiquitilazione è strettamente controllata da Mdm2, una E3 ligasi, che porta la proteina alla degradazione ad opera del proteasoma. pCAF e p300/CBP catalizzano l'acetilazione dei residui carbossi-terminali delle lisine di p53 (K320, K370, K372, K373, K381 e K382), che si sovrappongono con i siti di ubiquitilazione. L'acetilazione delle lisine impedisce la formazione di complessi tra p53 e Mdm2, mentre esperimenti condotti con un mutante p53 non acetilato mostrano una forte interazione con Mdm2 con conseguente degradazione di p53 (Tang et al., 2006).

Numerosi enzimi con attività acetiltransferasica come CBP, Tip60, GCN5 e PCAF acetilano l'oncoproteina c-Myc a livello di varie lisine portando ad un incremento della sua stabilità, questo perché viene impedita l'ubiquitilazione e la conseguente degradazione da parte del proteasoma (Patel et al, 2004;. Vervoorts et al, 2003). In contrasto l'acetilazione dipendente da p300 di c-Myc porta ad una maggiore degradazione (Faiola et al., 2005). Questi risultati indicano che l'acetilazione mediata da differenti fattori e livello di diverse lisine conduce la proteina a differenti destini.

Analogamente a quanto osservato per l'acetilazione e la deacetilazione degli istoni, l'equilibrio dinamico di queste due modificazioni nelle proteine non istoniche sembra essere mantenuto da un'interazione fisica e funzionale tra gli HAT e gli HDAC.

Un esempio è l'interazione tra p300 (HAT protein) e SIRT2 (HDAC protein) per la regolazione di p53. Il modello funzionale proposto indica che p300 aumenta indirettamente l'attività trascrizionale di p53 mediante acetilazione e la sua successiva attenuazione funzionale è invece mediata dall'azione della deacetilasi SIRT2.

L'interazione diretta tra enzimi con opposte attività come HAT e HDAC sembra giocare un ruolo chiave nella regolazione dei processi cellulari e nel controllo di bersagli proteici comuni.

Sulla base delle considerazioni sopra esposte appare chiaro che le modificazioni post-traduzionali possono influenzare l'attività delle proteine e dei fattori di trascrizione. È noto infatti che queste modifiche possono essere coinvolte in diversi meccanismi di regolazione che agiscono a vari livelli, dall'espressione genica fino alla modulazione dell'attività proteica. Da tempo il nostro gruppo di ricerca si occupa dello studio della proteina AIRE (AutoImmune REgulator). Nonostante vari studi condotti in vivo e vitro il meccanismo con cui questa proteina esplica il suo ruolo di modulatore trascrizionale rimane largamente sconosciuto. In questo studio abbiamo indagato se la proteina AIRE potesse essere soggetta a modifiche postraduzionali che potessero in qualche modo regolare la sua funzione di modulatore della trascrizione.

## Obiettivo dello studio

La proteina AIRE è conosciuta principalmente come un regolatore trascrizionale in grado di svolgere il duplice ruolo di attivatore e di repressore, probabilmente in funzione del contesto cellulare nel quale si trova. Il preciso meccanismo attraverso cui la proteina AIRE svolge il suo ruolo non è ancora del tutto chiaro, ma il suo corretto funzionamento è fondamentale per l'organizzazione e il mantenimento della tolleranza immunologica.

Recenti dati riportati in letteratura dimostrano l'acetilazione di AIRE e come questa modificazione in particolari domini possa influenzare il set di geni bersaglio regolati dalla proteina. Visti questi risultati nella prima parte del nostro studio abbiamo voluto indagare se l'acetilazione in altri domini, in particolare nell'NLS, fosse coinvolta nel determinare la stabilità e localizzazione della proteina, competendo anche con altre modificazioni post-traduzionali. Abbiamo inoltre investigato se ci fossero altri enzimi oltre p300 responsabili dell'acetilazione di AIRE e se questa modificazione si traducesse in un cambiamento della capacità trans attivante della proteina.

Poiché l'acetilazione è un processo reversibile, nella seconda parte dello studio abbiamo condotto degli esperimenti che ci permettessero di chiarire se AIRE venisse deacetilata. Abbiamo quindi verificato un possibile ruolo del complesso deacetilante HDAC1-HDAC2 in questo processo.

## Materiali e metodi

### Preparazione dei plasmidi

#### Plasmidi usati nel saggio di acetilazione

Il cDNA di AIRE (aa 1-517) è stato subclonato tramite l'utilizzo dell'enzima di restrizione EcoRV e inserito in HALO-Tag pHT2 vector (Promega).

Per l'analisi MS/MS il cDNA full-length di AIRE è stato amplificato e clonato nel plasmide pEF5HA (donato dal gruppo di Nunzio Bottini La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA) utilizzando i primers contenenti i siti di restrizione NotI e EcoRI. Il vettore pEFHA permette l'espressione dei costrutti in fusione con un tag N-terminale HA, sotto il controllo del promotore di alfa EF.

#### Plasmidi utilizzati nel saggio di deacetilazione

I cDNAs full-length di HDAC1 e HDAC2, clonati nel plasmide pCMV-XL5, sono stati acquistati dalla ditta OriGene (Rockville, MD).

#### Plasmidi utilizzati nell'analisi tramite microscopia a fluorescenza

Il cDNA full-length di AIRE è stato amplificato e successivamente clonato nel vettore Monster Green (GFP)-expression (Promega), attraverso l'utilizzo di primers che portavano i siti di restrizione per l'enzima EcoRV.

Le forme mutanti del costrutto pEFGFP-AIRE full-length (K102R, K111R, K131R, K133R, e K102Q, K111Q, K131Q, K133Q) sono state ottenute mediante mutagenesi sito specifica utilizzando i primers riportati in tabella 1.

Mutazioni	Oligonucleotidi
AIRE K102 Q	f:5'-CTGGACAGCTTCCCC <b>CA</b> AGATGTGGACCTCAGCCA r:3'-TGGCTGAGGTCCACATCT <b>TG</b> GGGGAAGCTGTCCAG
AIRE K 102 R	f:5'- CTGGACAGCTTCCCC <b>AG</b> AGATGTGGACCTCAGCCA r:3'- TGGCTGAGGTCCACATCT <b>CT</b> GGGGAAGCTGTCCAG
AIRE K 111 Q	f:5'-CTCAGCCAGCCCCGG <b>CAG</b> GGGAGGAAGCCCCCG r:3'-CGGGGGCTTCTCCCC <b>CTG</b> CCGGGGCTGGCTGAG
AIRE K111R	f:5'-CTCAGCCAGCCCCGG <b>AG</b> GGGAGGAAGCCCCCG r:3'-CGGGGGCTTCTCCCC <b>CCT</b> CCGGGGCTGGCTGAG
AIRE K131-133 Q	f:5'-CTCCCCACCC <b>CAG</b> AGGC <b>CAG</b> GCCTCAGAAGAGGCT r3'-AGCCTCTTCTGAGGC <b>CTGC</b> CT <b>CTG</b> GGTGGGGAG
AIRE K131-133 R	f:5'-CTCCCCACCC <b>AGG</b> AGGC <b>AGG</b> GCCTCAGAAGAGGCT r3'-AGCCTCTTCTGAGGC <b>CCTCCT</b> CT <b>CTG</b> GGTGGGGAG

Plasmidi utilizzati nel luciferase assay I

Il cDNA full-length di AIRE è stato amplificato e clonato nel plasmide pEF5HA come descritto precedentemente. Il plasmide che contiene una singola copia del promotore del gene reporter dell'insulina è stato fornito dal Prof. Paolo Moi (Università di Cagliari, Italia). Il promotore, pMG3-insulin, è stato clonato a monte del gene reporter della luciferasi. Il plasmide di controllo pGL4, guida l'espressione costitutiva della luciferasi Renilla ed è stato acquistato dalla Promega

### Plasmidi utilizzati nel luciferase assay II

Il cDNA codificante per la proteina AIRE è stato amplificato tramite primers che contengono il sito di restrizione riconosciuto dall'enzima XbaI e clonato nel vettore di espressione che contiene un GAL4 DNA-Binding domain (GAL4-DNA-BD fusion proteins, Promega).

### **Anticorpi utilizzati**

-Anticorpo monoclonale Anti-HA (clone 16B12) e anticorpo policlonale anti-FLAG acquistati rispettivamente dalla Covance (Berkeley, CA) e dalla Sigma (St. Louis, MO).

-Anticorpi policlonali anti-HDAC1, HDAC2 e anticorpo monoclonale mSIN3A (G.-11), sc-5299 acquistati dalla Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA).

-Anticorpo policlonale Acetylated- lysine polyclonal (9441) acquistato dalla Cell Signaling (Euroclone, Milan, Italy) e anticorpo policlonale anti HALO-Tag acquistato dalla Promega Corporation, (Madison, WI).

-Anticorpo anti-actina acquistato dalla Sigma.

-Anticorpi secondari per western blotting anti-mouse a anti-rabbit acquistati dalla GE Healthcare (Piscataway, NJ) e l'anti goat acquistato dalla Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA).

### **Colture cellulari**

Gli esperimenti condotti in questo studio sono stati eseguiti in linee cellulari ad aderenza Cos-1 (African green kidney Monkey).

Le cellule ad aderenza Cos-1 sono state fatte crescere in terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), con aggiunta di FBS (Siero Fetale Bovino) al 10%, 2mM di glutammina e gli antibiotici penicillina e streptomina (100 IU/ml di penicillina e 100

m g/ml di streptomina). Le colture cellulari sono state mantenute in incubatore a 37°C con atmosfera controllata di CO<sub>2</sub> al 5%.

Dopo aver aspirato il terreno di coltura, le cellule sono state lavate con circa 6 ml di PBS (Phosphate Saline Buffer) e tripsinizzate con 2 ml di tripsina, un'enzima proteolitico che agevola il distacco delle cellule dal substrato a cui sono adese. Dopo circa 3 minuti di incubazione a 37 gradi la cellule si staccano per effetto della tripsina e vengono risospese in terreno DMEM addizionato con i componenti descritti in precedenza.

Le cellule vengono quindi contate utilizzando una camera contacellule di Bürker, la quale consente di risalire al numero di cellule presente in 1 ml di risospensione. Grazie a questa informazione è possibile seminare una quantità nota di cellule in ogni piastra. Per gli esperimenti sono state utilizzate piastre Petri da 100 mm e sono state seminate  $1,2 \times 10^6$  cellule/piastra.

## **Transfezione transiente in cellule di mammifero col metodo della lipofezione**

### ***Principio del metodo***

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

### **Protocollo sperimentale utilizzato**

- il giorno precedente la transfezione le cellule vengono contate e divise in piastre Petri da 100 mm di diametro contenenti ciascuna 10 ml di DMEM, 10% FBS, 2mM glutammina e antibiotici (100 U/ml di penicillina e 100 m g/ml di streptomicina). Un'elevata efficienza di trasfezione richiede che le cellule raggiungano l'80-90% della confluenza al momento della trasfezione.
- le cellule vengono mantenute in un incubatore termostato a 37°C, umidità relativa controllata e 5% CO<sub>2</sub> per circa 24 ore;
- per la transfezione sono stati utilizzati 5 µg di ogni vettore di espressione codificante per le varie proteine necessarie all'esperimento;
- Il DNA dei plasmidi viene diluito in 90 µl medium DMEM privo di antibiotici e siero;
- Il liposoma viene aggiunto alla mix contenente DNA dei plasmidi e terreno;
- Incubare 20 minuti a temperatura ambiente;
- Distribuire la mix in ogni piastra contenente il monostrato cellulare addizionato di medium DMEM;
- Incubare a 37°C in atmosfera controllata di CO<sub>2</sub> al 5%;
- Dopo 4 ore sostituire il terreno con DMEM fresco con aggiunta di FBS 10% glutammina e antibiotici (100 IU/ml di penicillina e 100 m g/ml di streptomicina);
- Dopo 24 ore raccogliere le cellule ed eseguire il saggio di immunoprecipitazione.

## **Test di interazione in vivo in cellule di mammifero: saggio della co-immunoprecipitazione**

### ***Principio del metodo***

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

### **Protocollo sperimentale utilizzato**

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

- I pellets sono stati lisati in ghiaccio con 0,5 ml di Lysis Buffer (50mM di Tris-HCl a pH 7,5, 50 mM di NaCl, lo 0,2% di Nonidet P-40, 5 µm di ZnCl<sub>2</sub>, 30mM di Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 50 mM di NaF e 2mM di Sodio Orto Vanadato, 1 mM di phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) e inibitori delle proteasi (Roche).
- I lisati cellulari sono stati centrifugati a 12.000g per 12 minuti a 4°C e il supernatante (500-700 µg di proteina estratta da ogni esperimento) è stata prechiarificata con 10µl di resina al 50% di protein G sepharose (GE Healthcare) per 4 ore a 4°C. Dopo centrifugazione sono stati aggiunti al supernatante gli anticorpi specifici per ciascun esperimento secondo la diluizione

consigliata dalla casa produttrice per il protocollo di immunoprecipitazione. L'anticorpo è stato lasciato in incubazione in agitazione overnight alla temperatura di 4°C.

- Per recuperare il complesso proteico sono stati aggiunti a ogni campione 50µl di resina al 50% di protein G sepharose (GE Healthcare) e i campioni sono stati successivamente incubati per 4 ore a 4°C in agitazione. La resina è stata lavata 4 volte con PBS contenente lo 0,2% di NP40, e i complessi anticorpali sono stati rilasciati dalla resina tramite bollitura con 30µl di Sample Buffer 2x (4% SDS; 20% Glicerolo; 0.004% Blu di bromofenolo; 0.125 M Tris HCl (pH 6.8); 10% beta-mercaptoetanololo) per cinque minuti.

L'immunoprecipitato con anticorpo anti-HALO anticorpo è stato usato per il saggio acetilazione mentre l'immunoprecipitato con anticorpo anti-HA è stato utilizzata sia per l'analisi tramite spettrometria di massa, sia per rilevare l'interazione fisica di AIRE con le proteine del complesso HDACs / Sin3A e con la proteina pCAF.

## **Western Blotting**

### ***Principio del metodo***

*Il western blotting o immunoblotting è una tecnica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela contenente altre proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. Il primo passo della metodica prevede che il complesso proteico venga sottoposto a corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide contenente SDS al fine di separare le proteine denaturate in base al loro peso molecolare. Successivamente le proteine vengono trasferite su una membrana di nitrocellulosa e si procede al riconoscimento della proteina mediante l'utilizzo di anticorpi specifici. Tramite un sistema di rivelazione*

*basato sulla reazione perossidasi è possibile evidenziale su apposite lastre autoradiografiche un segnale chemiluminescente corrispondente al il segnale d'ibridazione dell'anticorpo.*

### **Protocollo sperimentale utilizzato**

Il campioni oggetto di studio, derivati dalla metodica di immunoprecipitazione precedentemente descritta, sono stati analizzati tramite corsa elettroforetica su gel di poliacrilamide al 10% (SDS-PAGE) e successivamente trasferiti su membrane di nitrocellulosa Hybond ECL (GE Healthcare). Dopo il trasferimento le membrane sono state incubate per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente con latte al 5% sciolto in TBST (100mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl , 0.1% tween 20) al fine di bloccare i siti aspecifici. Le membrane in seguito sono state ibridate con gli specifici anticorpi primari e secondari seguendo le diluizioni e i tempi d'incubazione previsti nel protocollo fornito dalla ditta produttrice. I segnali d'ibridazione sono stati rilevati utilizzando il metodo ECL Plus Chemiluminescence (GE Healthcare) e l'utilizzo di lastre autoradiografiche (Fujifilm).

Gli anticorpi anti lisine acetilate (1:2000) e anti HALO-tag (1:5000) sono stati usati per evidenziare la presenza di AIRE acetilata.

Il saggio di deacetilazione è stato condotto con l'utilizzo degli anticorpi anti HDAC1 e anti HDAC2 (1:10.000).

Gli anticorpi anti-flag (1:1000) e anti-HA sono stati usati per verificare l'interazione tra AIRE e pCAF.

L'anticorpo anti mSIN3A (1:2000) è stato usato per evidenziare l'interazione della proteina con AIRE.

Come anticorpi secondari sono stati usati l'anti mouse (1:5000) per AIRE-HA, HDAC1 e HDAC2, l'anti rabbit (3:10000) per pCAF-flag e l'anti goat (1:10000) per l'AIRE-HALO.

### **Mutagenesi sito specifica**

#### ***Principio del metodo***

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

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

### **Protocollo sperimentale utilizzato**

Il cDNA full-length di AIRE è stato amplificato e clonato tramite l'utilizzo dell'enzima di restrizione EcoRV nel vettore Monster Green (GFP)-expression vector (Promega).

Le forme mutanti del costrutto pEGFP-AIRE full-length (K102R, K111R, K131R, K133R, K102Q, K111Q and K102Q, K111Q, K131Q, K133Q) sono state ottenute mediante mutagenesi sito specifica utilizzando gli oligonucleotidi elencati nella Tabella 1 e il Kit QuickChange site-directed Mutagenesis (Stratagene) secondo il seguente schema:

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

<b>DNA plasmidico</b>	<b>50ng</b>
<b>Buffer 10x</b>	<b>5µl</b>
<b>Pfu DNA Polimerasi</b>	<b>1 µl</b>
<b>Primer Forward</b>	<b>130 ng</b>
<b>Primer Reverse</b>	<b>130ng</b>
<b>dNTP Stock Solution 10mM</b>	<b>1µl</b>
<b>H2O</b>	<b>Fino a 50 µl</b>

I file di amplificazione utilizzato per la mutagenesi è il seguente:

5 minuti a 95°C ,1 minuto a 95°C, 2 minuti a 42°C, 20 minuti a 68°C per 20 cicli.

Alla razione di PCR vengono aggiunte 10 unità di enzima di restrizione Dpn1 e viene incubata per 1 ora a 37°C.

Un'aliquota della PCR trattata con Dpn1 viene trasformata in cellule batteriche competenti E.Coli DH5α secondo il seguente protocollo:

-100 µl di cellule competenti E.Coli DH5α scongelate in ghiaccio

-5 µl PCR mutagenesi

-Incubare 30 minuti in ghiaccio

-Shock termico (90 secondi a 42°C , 2 minuti in ghiaccio)

-Aggiungere 900 µl di Medium SOC

-Incubare a 37 ° in agitazione per 1 ora

-Piastrare 100 µl in terreno solido nutritivo LB + Ampicillina 100 µg/ml

-Incubare la piastra over/night a 37 °C

-10/20 cloni sono stati prelevati dalla piastra e fatti crescere in 3 ml di terreno nutritivo liquido LB + Ampicillina 100 µg/ml a 37°C in agitazione over/night.

Il DNA plasmidico è stato estratto dalle colonie secondo il metodo della "minipreparazione" e sottoposto a sequenziamento mediante il metodo dei Big Dye Terminator e corsa

elettroforetica nel sequenziatore automatico ABI PRISM 3130xl. I cloni che portavano la correzione desiderata sono stati isolati e utilizzati per le applicazioni successive.

### **Analisi tramite microscopia a fluorescenza**

Le cellule Cos-1, fatte crescere secondo protocollo descritto in precedenza, sono state poi seminate su un vetrino per colture cellulari e trasfettate con 5µg dei costrutti pEGFP-AIRE wild type, GFP-AIRE-K102R-K111R-K131R-K133R, GFP-AIRE-K102Q-K111Q e GFP-AIRE-K102Q,K111Q,K131Q,K133Q. Dopo 48 ore dalla trasfezione le cellule cresciute sul vetrino sono state processate utilizzando il seguente protocollo:

- fissazione tramite immersione in metanolo per 5 minuti in ghiaccio
- fissazione tramite immersione in etanolo per 10 minuti a temperatura ambiente
- permeabilizzazione con PBS contenente 1% Triton X-100 per 10 minuti a temperatura ambiente.

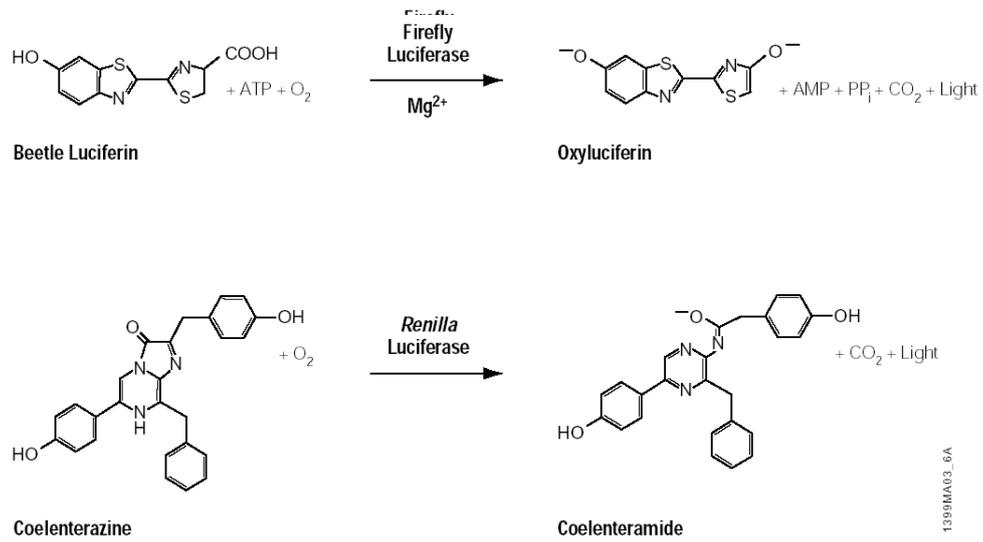
I nuclei cellulari sono stati evidenziati tramite colorazione con 2µg/ml 4,6-diamidino 2-phenylindole (DAPI, Invitrogen) diluito 1:1000 in PBS, incubato 5 minuti a temperatura ambiente. Sui vetrini è stato montato il copri-oggetto e sono stati analizzati al microscopio a fluorescenza Leica DM6000B microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Le immagini sono state acquisite tramite il software Leica Laser Microdissection LMD (Leica Microsystems, version 6.6.0) in seguito all'utilizzo di specifici filtri per la visualizzazione della fluorescenza (Leica Microsystems, B/G/R fluorescence filter).

## **Saggio della luciferasi**

### ***Principio del metodo***

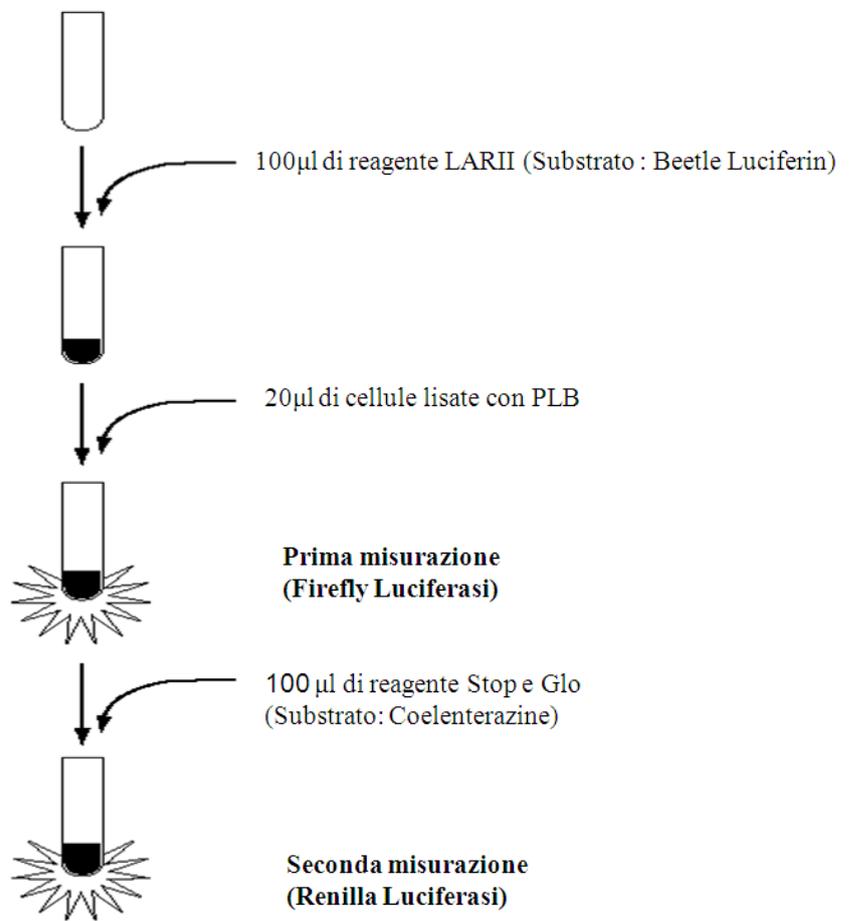
*Il sistema da noi utilizzato prevede l'utilizzo del vettore di espressione mammifero pBIND in cui sono stati clonati i cDNA di AIRE che porta un dominio GAL4 DNA-Binding-Domain ed esprime inoltre il gene della luciferasi Renilla Reniformis che può essere usata per normalizzare l'efficienza della transfezione. Il costrutto pG5Luc contiene cinque sequenze di consenso per GAL4 situate a monte del TATA box minimo che a sua volta si trova a monte del gene della luciferase Firefly (Photinus pyralis). Il costrutto pBIND-AIRE (normale o mutato) legherà le sequenze di consenso di GAL4 situate su pG5Luc, in questo modo attiverà la trascrizione del gene reporter luciferasi Firefly. Firefly e Renilla luciferasi hanno un'origine evolutiva distinta e per questo possiedono una struttura enzimatica diversa e richiedono substrati differenti. Queste differenze permettono di discriminare le loro reazioni bioluminescenti. Con il sistema Dual Luciferase Assay la luminescenza prodotta dalla Firefly Luciferasi viene silenziata mentre simultaneamente viene attivata la reazione luminescente della Renilla Luciferasi.*

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



### Protocollo sperimentale utilizzato

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



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

$$\frac{LUC1 / REN1}{LUC2 / REN2} \times 100$$

### **Luciferase assay I**

Le cellule Cos-1 sono state seminate in piastre Petri da 35mm di diametro ad una concentrazione di  $2 \times 10^5$  cellule/piastra e fatte crescere per 24 ore. Le cellule sono state co-transfettate con 300 ng del plasmide reporter pMG3-Insulin/Luc, 50 ng del plasmide di controllo pGL4, con 1,5  $\mu$ g del costrutto AIRE-HA full-length e 50ng del costrutto pCAF, utilizzando il metodo delle lipofezione con il transfettante Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Dopo 48 ore le cellule sono state lavate con PBS 1X e lisate con 200 $\mu$ l di Passive Lysis Buffer (Promega). L'attività luciferasica è stata determinate tramite l'utilizzo del kit Dual Luciferase Reporter Assay kit Promega (Madison, WI) attenendosi al protocollo raccomandato dalla ditta produttrice. La luminescenza è stata misurata con il luminometro Microlumat LB 96P (Berthold).

Il rapporto tra l'attività della luciferasi Firefly e della Renilla è stato poi confrontato con l'espressione dei costrutti valutati dalla scansione densitometrica della lastra ottenuta dall'ibridazione dei lisati totali con gli anticorpi anti-HA e anti-Flag

Per gli studi sull'inibizione della deacetilazione, è stato aggiunto al terreno di coltura il sodio butirrato (NaBu, Sigma) 4 ore dopo la trasfezione ad una concentrazione finale di 10mM e successivamente la cellule sono state incubate per 24 ore.

### **Luciferase assay II**

Le cellule Cos-1 sono state seminate in piastre Petri da 35mm di diametro ad una concentrazione di  $2 \times 10^5$  cellule/piastra per 24 ore. Le cellule sono state co-trasfettate con 2.5ug del costrutto AIRE-GAL4-DNA-BD fusion proteins e con 2.5ug del plasmide reporter pG5luc (Promega), utilizzando il metodo delle lipofezione con il transfettante Lipofectamine

2000 (Invitrogen). Dopo 24 ore è stato aggiunto al terreno di coltura il sodio butirrato alla concentrazione di 5mM. Dopo 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte e lisate con il Passive Lysis Buffer (Promega). Gli estratti cellulari sono stati testati per l'attività luciferasica utilizzando il Dual Luciferase Assay (Promega) in accordo con il protocollo sperimentale fornito.

Per il test di deacetilazione sono stati usati i costrutti pCMV-XL5-HDAC1 e pCMV-XL5-HDAC2 alla concentrazione di 300 ng e non è stato utilizzato l'inibitore sodio butirrato.

### **Analisi tramite spettrometria di massa**

#### ***Principio del metodo***

*La spettrometria di massa (MS) è una tecnica ampiamente utilizzata in biochimica e proteomica per l'identificazione e la caratterizzazione di proteine in lisati cellulari, organuli isolati o complessi proteici. Le tecniche classiche per la separazione delle proteine basate su centrifugazione, elettroforesi, o metodi cromatografici sono facilmente interfacciate alla spettrometria di massa. Le proteine una volta separate vengono convertite, tramite trattamento con proteasi sequenza-specifiche, in peptidi che risultano più adatti rispetto alle proteine intere per le analisi di MS. La spettrometria di massa misura la massa e la carica (rapporto m/z), calcolando il peso molecolare e il pattern di frammentazione dei peptidi derivati dalle proteine. Rappresenta pertanto un generale metodo di analisi per tutte le modifiche che cambiano il peso molecolare.*

### Protocollo sperimentale utilizzato:

Le cellule Cos-1 sono state fatte crescere e trasfettate col cDNA full-length di AIRE clonato nel vettore pEF5HA secondo le metodiche descritte precedentemente. Le cellule sono state poi lisate e immunoprecipitate con l'anticorpo anti-HA. Gli immunoprecipitati sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su SDS-PAGE al 10%. Il gel è stato sottoposto a tre lavaggi successivi con acqua e incubato in agitazione con SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) per un'ora a temperatura ambiente. La banda corrispondente all'altezza della proteina è stata escissa da gel e incubata in una soluzione di acetonitrile al 50%.

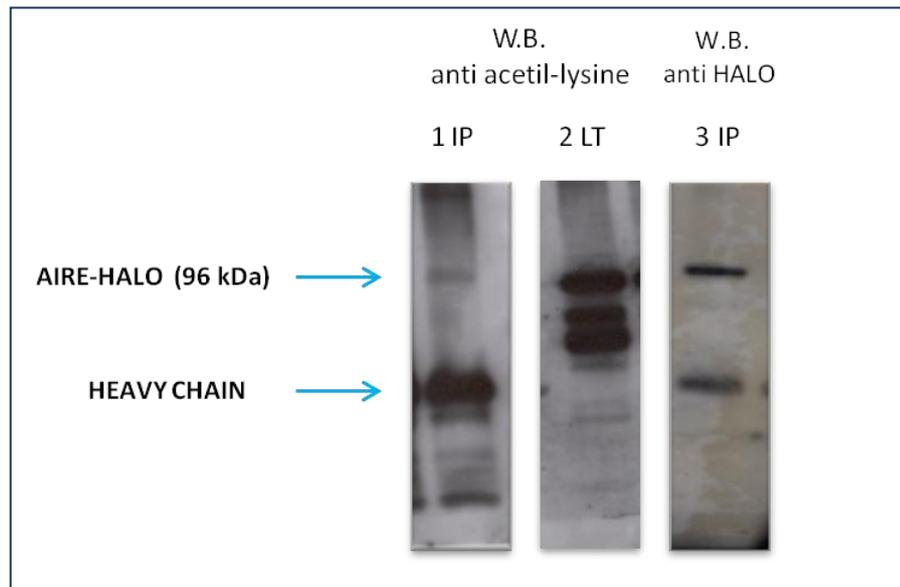
Lo stesso esperimento è stato condotto trasferendo tramite western blotting le proteine su membrana di nitrocellulosa dopo la corsa elettroforetica su gel SDS.

I peptidi proteolitici ottenuti dalla digestione della proteina tramite tripsina (quando separata su gel monodimensionale) o tramite endoproteinasi Glu-C (quando risolubilizzata da membrana di nitrocellulosa in seguito a western-blotting) sono stati analizzati mediante spettrometria di massa tramite lo spettrometro MALDI-TOF-MS utilizzando l'apparato Autoflex della Bruker Daltonics e lo spettrometro RP-HPLC-ESI-MS/MS ad alta risoluzione utilizzando un apparato Ultimate 3000 Micro-HPLC (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) connesso mediante un modulo regolatore di flusso FLM-3000 ad un apparato LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher, San Jose, CA, USA).

## Risultati

Inizialmente abbiamo condotto degli esperimenti di immunoprecipitazione al fine di verificare lo stato acetilato delle proteina AIRE.

Il cDNA di AIRE è stato clonato nel vettore di espressione HALO (HALO-AIRE, 96 kDa) ed è stato transfettato sia in cellule Cos-1. Dopo 24 ore la cellule sono state raccolte e i lisati cellulari sono stati immunoprecipitati e sottoposti ad analisi Western Blotting. Come mostrato nella figura 11 l'acetilazione AIRE è stato rilevata tramite l'utilizzo dell'anticorpo antiacetil-lisina che riconosce le lisine acetilate a livello della proteina. Per confermare la presenza della proteina AIRE nell'estratto cellulare è stata eseguita un'ibridazione con anticorpo anti AIRE-HALO, che ha dato un segnale totalmente sovrapponibile a quello della proteina AIRE acetilata.



### Figura 11: Acetilazione della proteina AIRE

Le cellule Cos-1 sono state trasfettate con il costrutto AIRE-Halo Tag pHT2 vector (96kDa). Le cellule sono state lisate e immunoprecipitate con l'anticorpo anti Halo. L'immunoprecipitato è stato rivelato tramite western blotting con l'anticorpo anti acetil-lisina (linea 1 e 2) e con l'anticorpo anti-Halo per verificare la presenza della proteina (linea 3)

IP: immunoprecipitato

LT: lisato totale

### Identificazione dei siti di acetilazione di AIRE tramite spettrometria di massa

Stabilita l'acetilazione di AIRE, abbiamo voluto identificare quali fossero precisamente i siti di AIRE target dall'acetilazione utilizzando la spettrometria di massa.

Un approccio comunemente utilizzato per lo studio delle modificazioni post-traduzionali è la spettrometria di massa (MS). Questa metodica riesce a dare dei risultati molto precisi in termini di sensibilità e permette l'identificazione simultanea di un particolare tipo di modificazione chimica in numerosi frammenti peptidici. La presenza di modificazioni covalenti nelle proteine influisce generalmente sul loro peso molecolare e l'incremento o il deficit di massa può essere rilevato tramite MS. La stabilità chimica della modificazione post-

traduzionale oggetto di studio è un parametro decisivo per la sua rilevazione efficiente. L'acetilazione della lisina è una modificazione molto stabile che porta ad un incremento di massa di +42 kDa. L'analisi MS/MS di un peptide che contiene lisine acetilate mostra quindi per tutti i frammenti che contengono l'acetil-lisina un incremento di massa di 42 kDa rispetto al peptide non modificato. Oltre alla sequenza amminoacidica dello specifico frammento peptidico esistono anche segnali dati dalla liberazione di ioni caratteristici della modificazione in esame. L'acetilazione della lisina genera segnali di ioni (diagnostic ion) che hanno rapporto massa/carica 126,091 e 143,118. (Dormeyer, W., Ott M., and Schnolzer M., 2005.). La presenza di questi segnali è una buona indicazione che il peptide corrispondente contenga l'acetil-lisina. L'interpretazione dei risultati ottenuti dall'analisi MS/MS tramite appositi programmi di calcolo affiancata al sequenziamento della proteina in esame forniscono un'indicazione precisa sulla modificazione post-traduzionale e sui siti modificati interessati.

### **L'acetilazione del dominio NLS è implicata nella localizzazione nucleare**

La proteina AIRE presenta nella sua sequenza amminoacidica 24 lisine potenziali siti di acetilazione (figura 12). Abbiamo eseguito esperimenti di spettrometria di massa al fine di determinare quale fosse lo stato di acetilazione di tutte le lisine distribuite nei differenti domini funzionali della proteina.

MATDAALRLLRLHRTEI AVAVDSAFPLLHALADHDVVPED**K**FQETLHL**K**E**K**EGCPQAFH  
ALLSWLLTQDSTAILDFWRVLF**K**DYNLERYGRLQPIILDSFP**K**DVDLSQPR**K**GR**K**PPAVP**K**  
ALVPPRLPT**K**R**K**ASEEARAAAPAALT PRGTASPGSQL**K**A**K**PP**K**KPESSAEQQRLPLGNG  
IQTMSASVQRAVAMSSGDVPGARGAVEGILIQQVFESGGS**K**KCIQVGGEFYTPS**K**FEDSG  
SG**K**N**K**ARSSSGP**K**PLVRA**K**GAQGAAPGGGEARLGQQGSVPAPLALPSDPQLHQ**K**NEDECA  
VCRDGGELICCDGCPRAFHLACLSPLREIPSGTWRCSSCLQATVQEVQPRAEPRPQEP  
PVETPLPPGLRSAGEEVRGPPGEPLAGMDTTLVY**K**HLPAPPSAAPLPGLDSSALHPLL CV  
GPEGQQNLAPGARCGVCGDGTDLRCTHCAAFAHWRCHFPAGTSRPGTGLRCRSCSGDVT  
PAPVEGVLAPSPARLAPGPA**K**DDTASHEPALHRDDLESLLSEHTFDGILQWAIQSMARPA  
APFPS

**Figura 12:** Sequenza aminoacidica proteina AIRE. In figura vengono evidenziate le lisine.

L'analisi è stata eseguita transfettando il vettore contenente la proteina AIRE-HA in cellule di mammifero Cos-1. Le cellule sono state trattate con sodio butirato 10mM, un potente inibitore degli enzimi HDACs, al fine di mantenere la proteina nello stato acetilato, inibendo l'azione delle acetiltransferasi endogene. I lisati cellulari sono stati sottoposti a immunoprecipitazione con anticorpi anti-HA e migrazione elettroforetica su SDS PAGE al 10%.

La banda corrispondente alla proteina AIRE è stata escissa da gel, digerita con l'enzima tripsina e con un'endoproteinasi Glu-C e sottoposta ad analisi mediante spettrometria di massa MALDI-TOF-MS e RP-HPLC-ESI-MS/MS ad alta risoluzione.

La figura 13 mostra il risultato dell'analisi di spettrometria di massa delle 24 lisine della proteina AIRE.



**Figura 13: Analisi tramite spettrofotometria di massa delle 24 lisine della proteina AIRE**  
*L'analisi è stata eseguita in presenza di sodio butirato (10mM ).*

Dall'analisi risulta che 11 di queste lisine presentano un aumento della massa di 42kDa compatibile con lo stato acetilato. Per 5 lisine K114-K120-K159-K161-K164 non è stato possibile stabilire con esattezza la presenza o l'assenza della modificazione, infatti l'analisi degli spettri di vari esperimenti condotti separatamente ha dato origine a risultati contrastanti. Le restanti 9 lisine sono risultate non acetilate.

Il nostro studio si è focalizzato in particolare sulle lisine acetilate del dominio NLS della proteina. L'analisi del campione mostra infatti che 4 delle 6 lisine localizzate del dominio NLS sono acetilate (K102, K111, K131, K133). Poiché questo dominio è responsabile della localizzazione nucleare di AIRE, abbiamo voluto indagare se lo stato acetilato potesse determinare la corretta localizzazione della proteina nel nucleo (Bjorses P. et al., 1999), (Rinderle C. et al., 1999).

La porzione N-terminale di AIRE contiene due gruppi di amminoacidi basici 110RKGRK114 e 131KRK133, struttura simile a quella di un classico NLS bipartito (Finnish-German APECED Consortium, 1997).

Pitkanen et al nel 2001 hanno dimostrato la capacità dell'N-terminale di AIRE (aminoacidi 101-141) di trasportare la proteina fluorescente "green fluorescent protein" (GFP) nel nucleo, supportando ulteriormente l'ipotesi dell'esistenza di un NLS funzionale all'interno di questa regione (Pitka"nen J, 2001).

Successivi studi di mutagenesi condotti da Ilmarinen et al. (Ilmarinen 2005) hanno dimostrato che i residui 131-133 sono deputati a funzionare come una NLS monopartito che interagisce con il sito di legame minore delle importine  $\alpha$ . Questi studi si basano sulla mutagenesi dei residui 113, 114 e 131-133. La perdita di attività NLS è stata evidenziata solo dopo mutazione dei residui 131-133, indicando una probabile NLS monopartito. Gli stessi

autori hanno dimostrato che la proteina AIRE con mutazioni R113A, K114E, e R113A-K114A mostra un pattern di espressione nucleare puntiforme simile a quella di AIRE *wild type*, mentre è stata osservata una totale perdita di funzionalità dell'NLS quando vengono mutate le lisine K131 e K133; questo risultato ha portato gli autori a concludere che l'NLS fosse monopartito.

In contrasto con questi risultati Saltis et al (Saltis 2008) teorizzano che il legame dell'NLS con sito minore delle importine  $\alpha$  è tipicamente coerente con un NLS bipartito. I residui 110-111 e 113-114, così come quelli in posizione 131-133, sono altamente conservati in tutte le specie. Gli autori affermano dunque che considerando tutti gli aminoacidi da 110 a 133 è corretto considerare l'NLS di AIRE bipartito.

A tutt'oggi l'esatto meccanismo e gli specifici aminoacidi coinvolti nella localizzazione di AIRE non sono stati ancora completamente chiariti.

Il traffico nucleo/citoplasma può essere un fattore importante nella regolazione della funzione di AIRE e, poiché l'acetilazione delle lisine dell'NLS regola la distribuzione nucleo/citoplasma di diverse proteine, abbiamo voluto indagare più in dettaglio se l'acetilazione delle lisine del dominio NLS di AIRE avesse un ruolo nei meccanismi di importazione nucleare e nella sua localizzazione subcellulare. Per analizzare il ruolo di questo cluster di lisine abbiamo utilizzato saggi di mutagenesi e microscopia a fluorescenza.

Il cDNA di AIRE è stato inizialmente clonato in un vettore esprime la proteina fluorescente verde (GFP), successivamente abbiamo creato attraverso mutagenesi sito specifica dei costrutti mutati che avessero l'aminoacido l'arginina (R) al posto delle lisine in posizione K102, K 111, K131, K133. Questa modificazione mima, per carica, lo stato delle lisine non acetilate (carica positiva). Viceversa per mimare lo stato di acetilazione delle lisine,

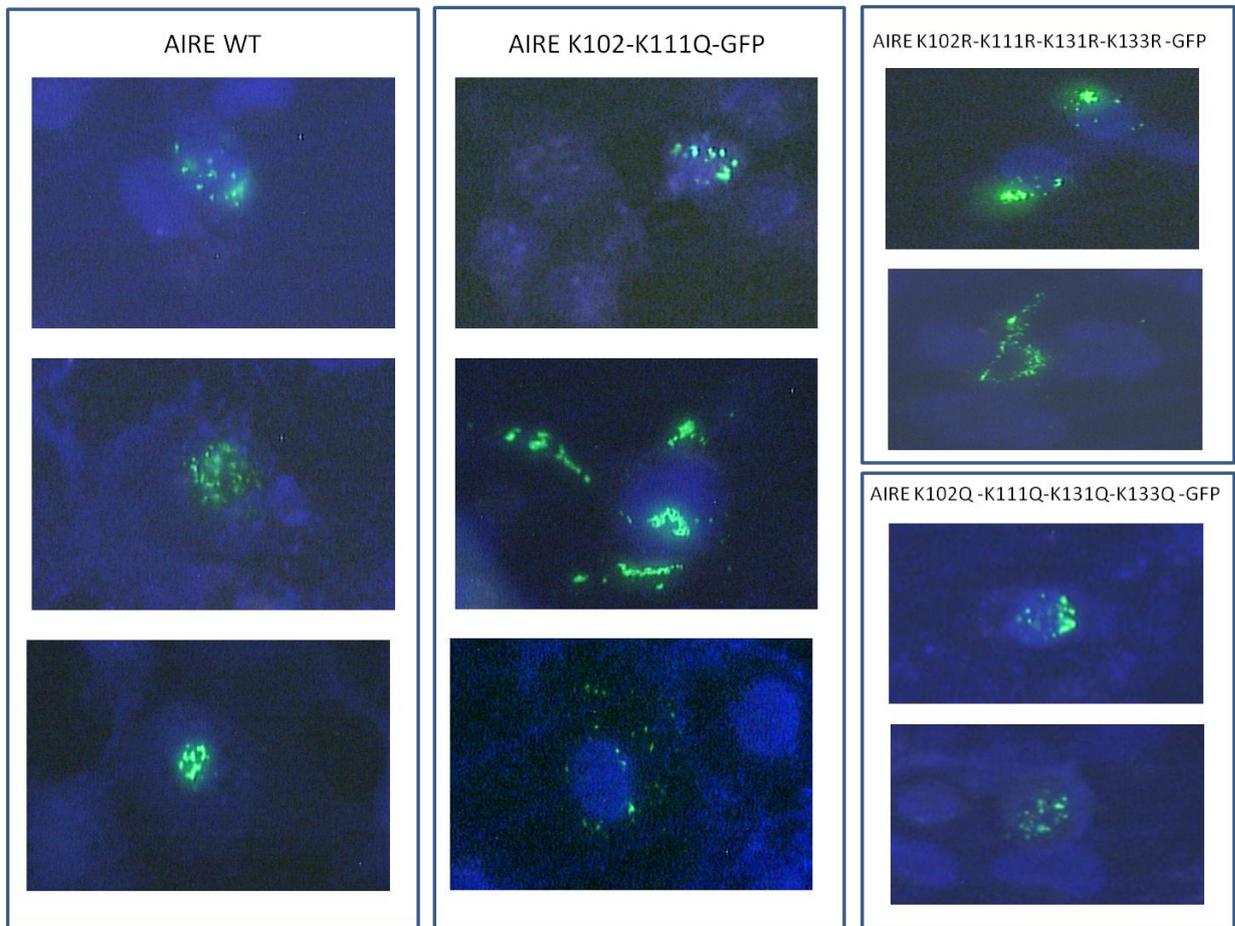
solo per carica, abbiamo realizzato dei costrutti che avessero nelle stesse posizioni della lisina una glutamina (Q) (carica neutra) (Hyndman, 2011).

Tutti i costrutti sono stati transfettati in cellule Cos-1 e tramite analisi con microscopia a fluorescenza è stato possibile valutare l'emissione di fluorescenza, data dalla presenza all'interno del costrutto della proteina GFP, e quindi stabilire la localizzazione della proteina a livello cellulare.

Come mostrato in figura 14, il costrutto GFP-AIRE WT presenta una localizzazione della proteina prevalentemente nucleare. L'analisi ha evidenziato inoltre che il mutante AIRE-K102R-K111R-K131R-K133R-GFP mostra un'alterata distribuzione della proteina e l'assenza dei tipici nuclear dots. Sostituendo le stesse quattro lisine con la glutamina AIRE-K102Q-K111Q-K131Q-K133Q-GFP, viene invece ripristinata una distribuzione nucleare della proteina del tutto simile a quella del *wild type*. La sostituzione delle sole lisine K102 e K111 con la glutamina (Q) mostra una distribuzione diffusa sia a livello nucleare che citoplasmatico. Questo dato potrebbe indicare che per la localizzazione nucleare di AIRE sia importante l'acetilazione di tutte e quattro le lisine contemporaneamente.

Questi risultati dimostrano che l'acetilazione delle lisine dell'NLS può effettivamente influenzare la localizzazione sub-cellulare di AIRE. La presenza dell'arginina in sostituzione della lisina compromette la corretta localizzazione nucleare di AIRE. Questa alterata localizzazione può essere attribuita solo in minima parte alla sostituzione aminoacidica, poiché lisina e arginina sono aminoacidi carichi positivamente ed hanno una struttura simile. Al contrario, riteniamo che la diversa distribuzione della proteina possa essere dovuta all'impossibilità dell'arginina di legare un gruppo acetile, confermando che l'acetilazione è

coinvolta nel corretto posizionamento cellulare di AIRE. Quando la lisina è acetilata, una condizione mimata dalla glutammina, AIRE mostra una maggiore affinità per la importina, un gruppo di proteine che guidano la sua traslocazione nel nucleo. Non si può escludere però che la maggiore presenza di AIRE acetilata a livello nucleare sia dovuta alla sua ridotta esportazione. Infatti AIRE contiene un segnale di esportazione nucleare (NES), all'interno del dominio HSR, la cui funzione non è stata ancora completamente chiarita.



**Figura 14: Acetilazione del dominio NLS di AIRE è richiesta per una corretta localizzazione nucleare.**

Le cellule Cos-1 sono state trasfettate con GFP- AIRE *wild type* , AIRE-K102Q-K111Q-GFP, AIRE-K102R-K111R-K131R-K133R-GFP e AIRE-K102Q-K111Q-K131Q-K133Q-GFP. L'analisi tramite microscopia a fluorescenza mostra che il quadruplo mutante R presenta una localizzazione cellulare diffusa, differente da quella del GFP- AIRE *wild type* che mostra la tipica localizzazione a livello nucleare. Una localizzazione simile al *wild type* viene ripristinata in seguito a trasfezione del quadruplo mutante Q. La trasfezione del costrutto AIRE- K102Q-K111Q mostra localizzazione sia nucleare che citoplasmatica. I nuclei delle cellule sono stati controcolorati col DAPI.

### **AIRE interagisce in vivo con p300 e pCAF**

Dimostrata l'acetilazione di AIRE abbiamo successivamente valutato se ci fossero enzimi con attività acetiltransferasica in grado di acetilarla.

L'analisi della sequenza di AIRE mostra la presenza di un LXXLL motif fiancheggiato da una sequenza proline-rich PXXP all'interno di un dominio di transattivazione. Questo motivo è presente anche in altri fattori di trascrizione come p53, IRF3, EKLF e FoxO. Nel caso di p53 questo motivo rappresenta un duplice sito di attacco per p300, coattivatore trascrizionale con attività acetiltransferasica che forma un complesso proteico con CBP (Dornan et al, 2003; Van der Heide e Smidt, 2005. Akiyoshi et al, 2004). p300 ha attività acetiltransferasica sia a livello degli istoni sia a livello di proteine non istoniche. L'acetilazione di queste proteine, per la maggior parte fattori di trascrizione, porta alla regolazione di differenti funzioni biologiche inclusa l'affinità di legame al DNA, la regolazione dell'attività trascrizionale, la stabilità e la localizzazione cellulare.

Sulla base di queste evidenze abbiamo condotto inizialmente un esperimento di co-immunoprecipitazione in cellule di mammifero Cos-1, trasfettando il costrutto contenente la proteina AIRE (AIRE-HA) e quello contenente la proteina p300-Flag. Il costrutto di AIRE è stato immunoprecipitato dai lisati cellulari mediante un anticorpo che riconosce l'epitopo legato alla proteina (anti-HA). Gli immunoprecipitati sono stati analizzati attraverso Western Blotting per verificare la presenza di p300 con specifico anticorpo verso l'epitopo della proteina (anti-Flag).

Questi risultati ci portano a concludere che AIRE possa essere aggiunto al numeroso elenco di fattori di trascrizione che possiedono motivi LXXLL contigui a una sequenza ricca in prolina, necessari per l'acetilazione mediata da p300.

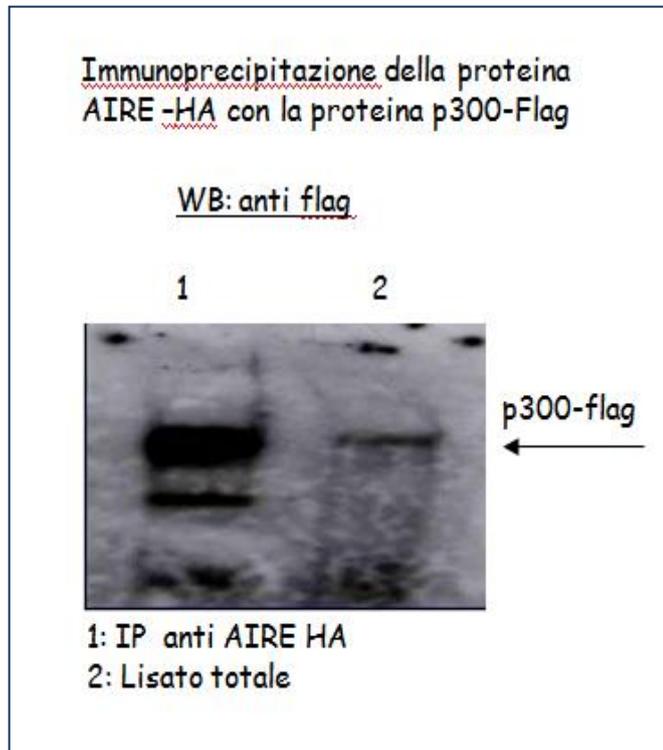
Questi risultati sono in accordo con i dati recentemente pubblicati da Saare et al.; gli autori hanno dimostrato che AIRE è acetilata in cellule in coltura e la sua acetilazione aumenta in presenza di CBP e p300. Gli autori hanno inoltre verificato che p300 co-localizza con AIRE a livello nucleare e questo favorisce la formazione dei caratteristici nuclear dots (ND) (Saare 2012).

Abbiamo condotto ulteriori esperimenti per valutare se altri enzimi responsabili dell'acetilazione degli istoni e di vari altri fattori di trascrizione fossero in grado di acetilare AIRE. Poiché il coattivatore pCAF è stato scoperto attraverso la sua associazione con la p300 e CBP ed ha un'attività acetilasica intrinseca, ci siamo concentrati principalmente su questa proteina e abbiamo studiato se AIRE potrebbe essere da questa acetilata.

Abbiamo eseguito un esperimento analogo a quello condotto per p300 per verificare l'interazione tra AIRE e la proteina pCAF.

In cellule di mammifero Cos-1 è stato trasfettando il costrutto contenente la proteina AIRE (AIRE-HA) e quello contenente la proteina pCAF-Flag. Il costrutto di AIRE è stato immunoprecipitato dai lisati cellulari mediante un anticorpo che riconosce l'epitopo legato alla proteina (anti-HA). Gli immunoprecipitati sono stati analizzati attraverso Western Blotting per verificare la presenza di pCAF con specifico anticorpo verso l'epitopo della proteina (anti-Flag).

La figura 15(A e B) mostra come la proteina AIRE è in grado di interagire fisicamente sia con la proteina p300 sia con la proteina pCAF.



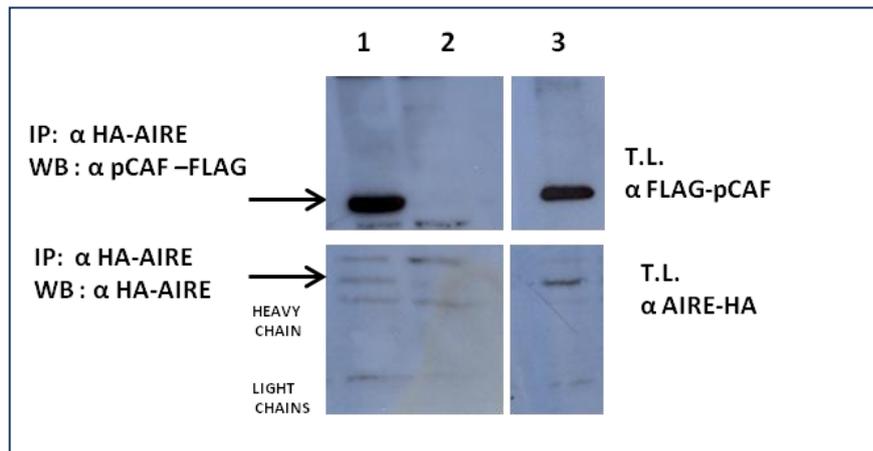
**Figura 15:**

**A) AIRE interagisce in vivo con p300 .**

Le cellule Cos-1 sono state co-trasfettate con il costrutto pEF5-HA-AIRE e con il pCMV-FLAG p300. I lisati sono stati immunoprecipitati utilizzando l' anticorpo anti-HA e successivamente è stata verificata la presenza dell'interazione con la proteina pCAF tramite l'utilizzo dell'anticorpo specifico anti-Flag (colonna 1). Come controllo di espressione è mostrato il corrispondente lisato totale della proteina p300 (colonna 2).

LT: lisato totale

IP: immunoprecipitato



### B) AIRE interagisce in vivo con pCAF.

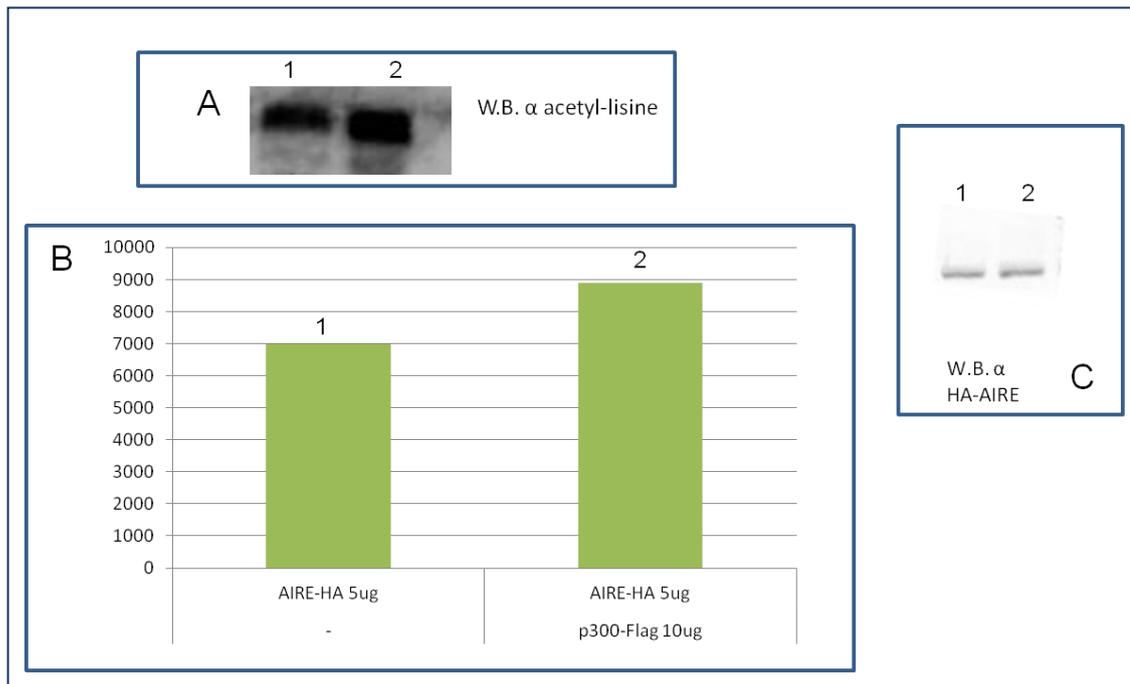
Le cellule Cos-1 sono state co-trasfettate con il costrutto pEF5-HA-AIRE e con il pCMV-FLAG pCAF. I lisati sono stati immunoprecipitati utilizzando l' anticorpo anti-HA e successivamente è stata verificata la presenza dell'interazione con la proteina pCAF tramite l'utilizzo dell'anticorpo specifico anti-Flag (colonna 1). Il controllo negativo dell'esperimento (colonna 2), mostra l'assenza delle proteine. Come controllo di espressione sono mostrati i corrispondenti lisati totali delle due proteine (colonna 3).

LT: lisato totale

IP: immunoprecipitato

### AIRE è acetilata da pCAF che ne aumenta la capacità transattivante

Successivamente abbiamo voluto verificare se AIRE potesse essere direttamente acetilata *in vivo* da pCAF. Abbiamo eseguito un test di acetilazione cotrasfettando in cellule Cos-1 AIRE-HA e pCAF-Flag in presenza di inibitori delle deacetilasi. I lisati cellulari sono stati poi analizzati mediante immunoprecipitazione utilizzando un anticorpo in grado di riconoscere tutte le lisine acetilate all'interno della proteina. La figura 16 mostra come la co-espressione di AIRE e pCAF aumenti l'acetilazione di AIRE.



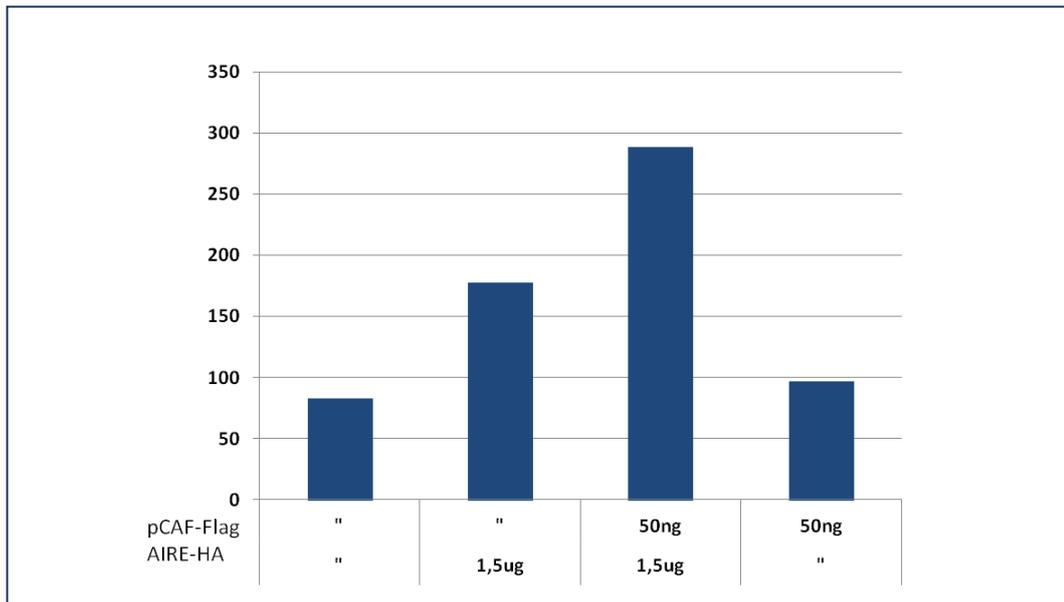
**Figura 16: pCAF incrementa l'acetilazione di AIRE**

**A:** Le cellule Cos-1 sono state trasfettate col costrutto pEF5-HA-AIRE (5ug) e con pCMV-FLAGpCAF (10ug)

**B:** L'analisi densitometrica tramite il software Image J mostra come la presenza di pCAF determini un aumento dell'acetilazione di AIRE

**C:** L'analisi western blotting mostra costanti livelli di AIRE-HA

Poichè pCAF ha anche un ruolo di regolatore trascrizionale abbiamo voluto esplicitare la possibilità che fosse coinvolto nella regolazione dell'attività trascrizionale di AIRE. Abbiamo quindi eseguito un test di transattivazione *in vivo* attraverso il saggio della luciferasi, in presenza del promotore dell'insulina. AIRE transattiva il gene reporter della luciferasi legandosi al promotore dell'insulina (pMG3-Luc), ma quando viene cotrasfettato pCAF si nota un aumento di questa transattivazione. Come mostrato in figura 17 l'over-espressione di pCAF aumenta la transattivazione del promotore dell'insulina se comparato con l'attività data dalla sola proteina AIRE.



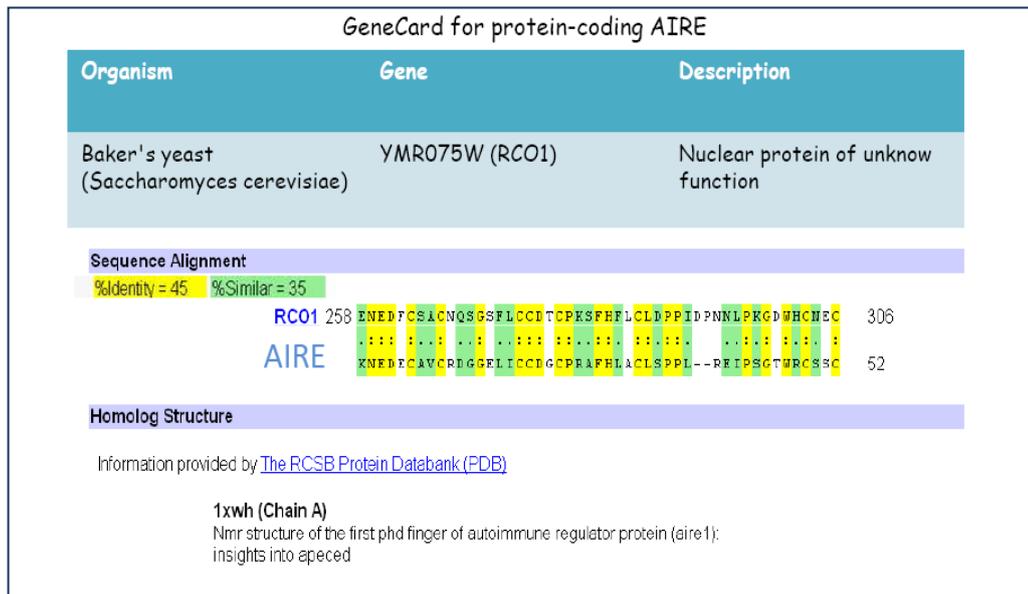
**Figura 17: pCAF aumenta il potere transattivante di AIRE**

Il saggio luciferasico è stato condotto trasfettando le cellule con il plasmide pMG-3 insulin/Luc che porta il gene reporter per la luciferasi, con 1,5 ug di pEF5HA-AIRE e 50 ng di pCMV-FLAG-pCAF. Le cellule sono state fatte crescere per 24 ore e i lisati sono stati testati per l'attività luciferasica. Il grafico mostra l'aumento della capacità transattivante di AIRE in presenza di pCAF.

### **AIRE è deacetilata in vivo**

Un altro obiettivo del nostro lavoro è stato valutare se AIRE fosse deacetilata, poiché l'acetilazione è un processo cellulare reversibile.

Una comparazione tra i domini strutturali di AIRE e quelli di alcune proteine di lievito coinvolte nel processo di acetilazione e deacetilazione ha evidenziato un'alta omologia di struttura della proteina AIRE con la proteina RCO1 a livello dei PHD (figura 18).



**Figura 18: AIRE mostra elevata omologia di struttura con la proteina RCO1.**

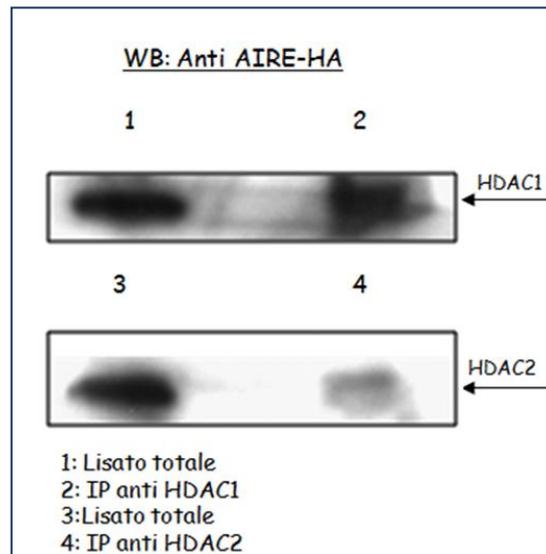
La comparazione tra i domini strutturali di AIRE e quelli di alcune proteine di lievito coinvolte nel processo di acetilazione e deacetilazione ha evidenziato un'alta omologia di struttura della proteina AIRE con la proteina RCO1 a livello dei PHD.

RPD3	Regola la trascrizione attraverso l'attività acetiltransferasica degli istoni
Sin3p	Coinvolta nella repressione trascrizionale, fa parte del complesso istone diacetilasi
HDAC3	Attività acetiltransferasica fa parte della famiglia dei geni HDAC
Sin3A	Componente della famiglia dei geni HDAC con attività diacetilasica

**Figura 18: Partner proteici della proteina RCO1.**

Alcuni dei partners proteici con i quali la proteina RCO1 interagisce sono RPD3, Sin3A, HDAC3 e come mostrato in figura 18 questi hanno attività deacetilante. Gli omologhi mammiferi di queste proteine possono essere complessivamente identificati nel *HDAC1-HDAC2/Sin3A-complex*.

In un nostro precedente lavoro (Meloni et al 2010), abbiamo già dimostrato che AIRE è in grado di interagire con HDAC 1 e HDAC 2 (figura 19). È noto che HDAC1 e HDAC2 fanno parte del *HDAC1-HDAC2/Sin3A-complex* e svolgono un ruolo chiave nella repressione epigenetica e nella regolazione trascrizionale anche delle proteine non istoniche. Un numero sempre crescente di proteine non istoniche sono state descritte essere oggetto di deacetilazione reversibile da parte degli HDACs. Tra questi obiettivi non-istonici ci sono fattori di trascrizione, recettori ormonali, trasduttori di segnale e proteine del citoscheletro.



**Figura 19: AIRE interagisce con le proteine HDAC 1 e HDAC2.**

Le cellule Cos-1 sono state trasfettate con AIRE-HA full-length. I lisati sono stati immunoprecipitati utilizzando gli anticorpi per le proteine endogene HDAC1 e HDAC2 ed è stata successivamente verificata la presenza dell'interazione con AIRE tramite l'utilizzo dell'anticorpo specifico anti-HA.

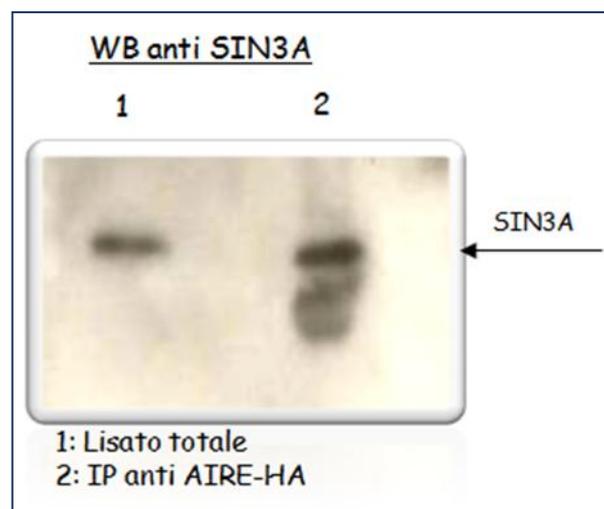
#### **AIRE interagisce in vivo con l' HDAC1- HDAC2 /SIN3A complex**

Negli eucarioti HDAC1 e 2 esistono come componenti di base dei due complessi deacetilasi: il complesso Sin3 e il complesso Mi-2/NuRD. È stato dimostrato che il complesso Sin3 (Sin3A, HDAC1 e HDAC2) è in grado di associarsi direttamente ad un gran numero di regolatori trascrizionali. Questo legame porta alla deacetilazione delle lisine e alla regolazione di molte funzioni cellulari essenziali.

Al fine di confermare l'interazione tra AIRE e il complesso deacetilante HDAC1-HDAC2/Sin3A abbiamo eseguito esperimenti per testare la capacità d'interazione in vivo con la proteina Sin3A attraverso trasfezione transiente in cellule di mammifero Cos-1.

Le cellule Cos-1 esprimono in maniera endogena la proteina Sin3A, abbiamo quindi transfettato solo il vettore esprimente AIRE (AIRE-HA). I lisati cellulari sono stati poi immunoprecipitati con l'anticorpo specifico per la proteina Sin3A.

Come mostrato in figura 20 la proteina AIRE immunoprecipita con la proteina endogena Sin3A. Questi esperimenti ci hanno permesso di evidenziare l'interazione fisica di AIRE con le proteine del complesso corepressorio con attività deacetilante HDAC1, HDAC2 e Sin3A (figura 20).



**Figura 20: AIRE interagisce con la proteina SIN3A.**

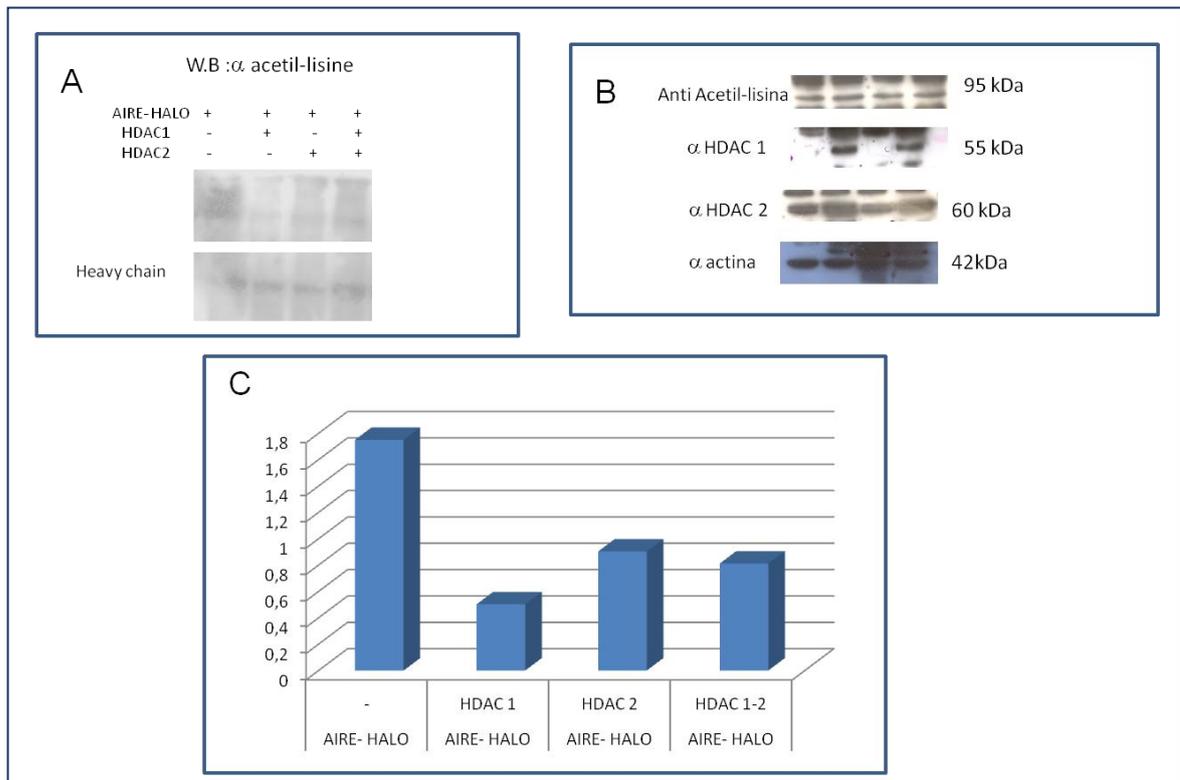
Le cellule Cos-1 sono state trasfettate con AIRE-HA full-length. I lisati sono stati immunoprecipitati utilizzando gli anticorpi per la proteina endogena SIN3A ed è stata successivamente verificata la presenza dell'interazione con AIRE tramite l'utilizzo dell'anticorpo specifico anti-HA.

Questi risultati suggeriscono che il legame di AIRE al complesso SIN3A/HDAC1-2 potrebbe risultare in una deacetilazione di AIRE.

Per valutare questa possibilità abbiamo eseguito un saggio di deacetilazione in cellule di mammifero in presenza e in assenza di HDACs.

L'esperimento è stato eseguito transfettando in cellule Cos-1 il costrutto AIRE-HALO in assenza e in presenza delle proteine HDAC1 e HDAC2. La proteina Sin3A non è stata transfettata ed è stata sfruttata la sua espressione endogena nella linea cellulare utilizzata per l'esperimento. Le cellule sono state successivamente immunoprecipitate usando l'anticorpo anti HALO, è stato valutato poi il livello di acetilazione tramite analisi Western Blotting utilizzando l'anticorpo specifico anti-acetilisina, che riconosce tutte le lisine acetilate all'interno della proteina. Come mostrato dal grafico in figura 21 il livello di acetilazione della proteina AIRE diminuisce notevolmente in presenza del complesso deacetilante, confermando la nostra iniziale ipotesi.

Un ruolo predominante sulla deacetilazione di AIRE sembra dato dalla proteina HDAC1, la cui azione porta ad una diminuzione del segnale di acetilazione del 71%. La proteina HDAC2 determina invece un decremento dell'acetilazione del 48%. L'azione combinata delle due proteine porta ad una diminuzione dell'acetilazione di circa il 53 %, valore simile alla media dei due valori dati dalle singole proteine, non sembra quindi esserci effetto cumulativo dato dalla presenza di entrambi i costrutti.



**Figura 21: AIRE è deacetilata dal complesso HDAC1-2/SIN3A**

**A:** Le cellule Cos sono state trasfettate con il costrutto AIRE-HALO e con i costrutti HDAC1 e HDAC2. La proteina SIN3A è espressa costitutivamente nelle cellule Cos, ne viene sfruttata la presenza endogena. I lisati totali sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo anti-HALO. Il pannello A mostra il segnale dato dall'ibridazione con anti acetil-lisina.

**B:** La figura mostra i lisati totali dei costrutti transfettati. Si nota la presenza di HDAC2 anche nei campioni nei quali non è stato transfettato, L'anticorpo utilizzato riconosce quindi anche la proteina endogena.

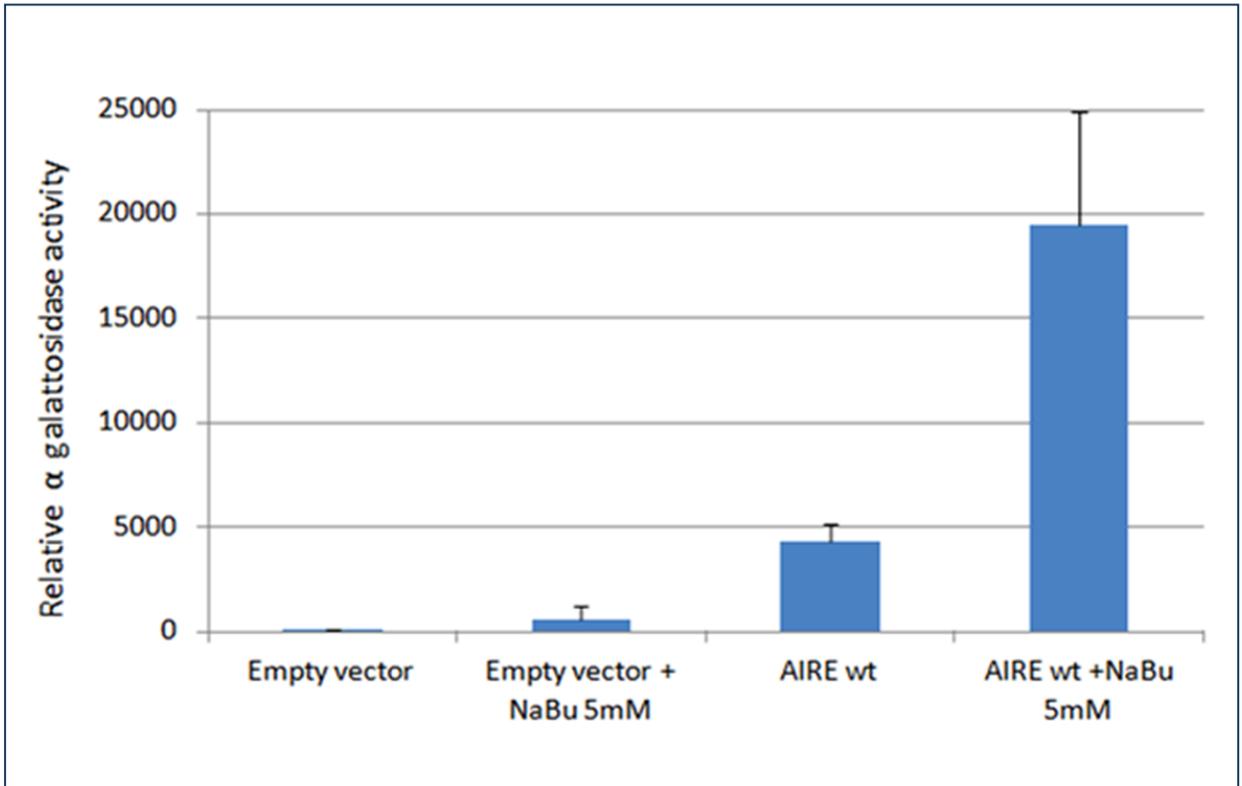
**C** Dopo Western Blotting la lastra è stata sottoposta ad analisi densitometrica tramite il programma Image J. Il livello di acetilazione di AIRE risulta diminuito del 71% in presenza di HDAC1, e del 48% in presenza di HDAC2. Trasfettando entrambi i costrutti si ha una diminuzione del livello di acetilazione di circa il 53%.

### **Gli HDACs reprimono la capacità transattivante di AIRE**

Abbiamo voluto ulteriormente indagare se il complesso HDAC1-HDAC2 fosse coinvolto nella regolazione dell'attività trascrizionale di AIRE, poiché gli HDACs sono dei noti co-regolatori trascrizionali. Per verificare questa ipotesi abbiamo eseguito una serie di esperimenti in cellule Cos-1 usando il sistema GAL4. In particolare, il cDNA di AIRE è stato clonato in un vettore GAL4-DNA binding domain, e l'attivazione trascrizionale è stata misurata attraverso un plasmide reporter contenente un gene di luciferasi (pGL3-Luc).

Abbiamo eseguito un primo saggio di transattivazione di AIRE in presenza di inibitori delle deacetilasi. Come mostrato in figura 22 il trattamento con sodio butirato aumenta l'attività trascrizionale della proteina AIRE. L'inibizione dell'attività degli HDACs mediante aggiunta di sodio butirato ha portato ad un aumento della quantità relativa di luciferasi di circa 4 volte. Probabilmente questo effetto è dovuto allo stato di iperacetilazione della proteina.

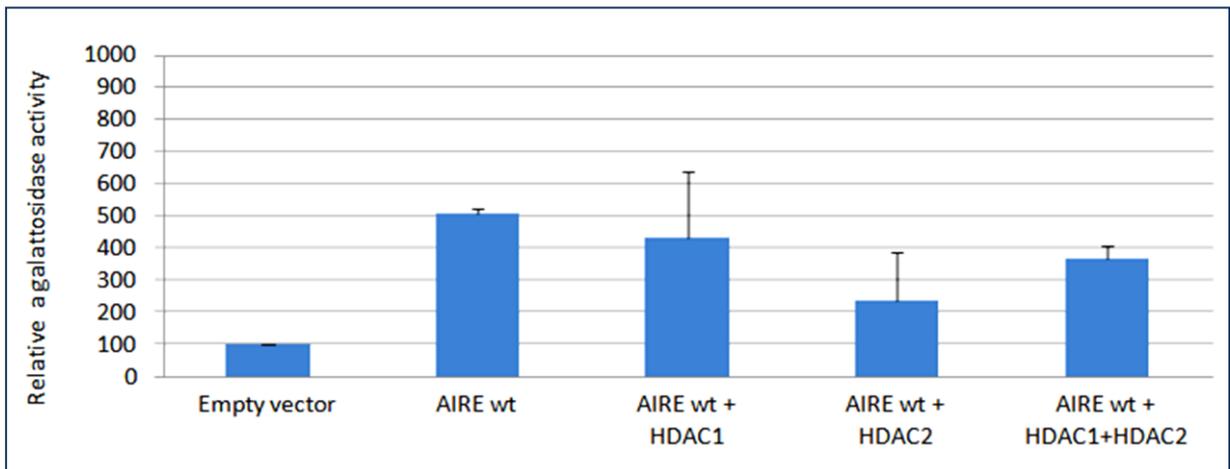
Infine abbiamo ripetuto lo stesso esperimento co-trasfettando AIRE e gli HDACs. I risultati presentati in figura 23 mostrano come in presenza di HDACs l'attività transattivante di AIRE diminuisca. Questo risultato suggerisce che la capacità di AIRE di transattivare il gene reporter è modulata dall'attività deacetilante degli HDACs.



**Figura 22: la transattivazione di AIRE è regolata dall'inibizione degli HDACs**

Le cellule Cos-1 sono state transfettate col vettore AIRE GAL4 in presenza e in assenza dell'inibitore delle deacetilasi (sodio butirato 5mM). L'inibizione degli HDACs determina un aumento della capacità di AIRE di transattivare il gene reporter di circa 4 volte rispetto ad AIRE transfettato in assenza di inibitori.

Il vettore GAL4 transfettato come controllo non mostra segnale di transattivazione né in presenza né in assenza di inibitori.



**Figure 23 : La capacità transattivante di AIRE è regolata negativamente dagli HDACs**

Le cellule Cos-1 sono state transfettate col costrutto AIRE GAL4 e con i costrutti pCMV-XL5-HDAC1 e pCMV-XL5-HDAC2.

L'esperimento è stato ripetuto co-trasfettando AIRE con entrambi gli HDACs. La capacità di AIRE di transattivare il gene reporter risulta diminuita in presenza degli HDACs.

Il vettore GAL4 transfettato come controllo non mostra segnale di transattivazione.

## Discussione

La proteina AIRE contiene domini strutturali tipici dei regolatori trascrizionali (Finnish-German APECED Consortium, 1997. Nagamine K. et al, 1997) che sono altamente conservati nel topo (Blehschmidt K. et al, 1999),(Mittaz L. et al ., 1999), (Wang CY. et al., 1999).

La proteina AIRE si localizza preferenzialmente a livello nucleare, in particolari strutture dette nuclear dots (ND), che sono strettamente legate alla matrice nucleare e sono tra le strutture cellulari più studiate. L'Integrità dei nuclear dots è alterata in alcune patologie gravi e la loro disgregazione (talvolta reversibile) si associa alla perdita del controllo trascrizionale di alcune proteine come p53, Laf-1, Daxx, che sono strettamente associate con i ND (Akiyoshi H. et al., 2004), (Ilmarinen T. et al., 2005), (Tao Y. et al., 2006).

Quando AIRE è espressa transitoriamente in colture cellulari si può osservare una sua localizzazione a livello del citoplasma dove si assembla in filamenti, microtubuli o aggregati di dimensioni diverse (Bjorses P. et al., 1999), (Rinderle C. et al., 1999). L'N-terminale di AIRE, e in particolare i residui amminoacidici nelle posizioni 101-141, sono in grado di dirigere la proteina GFP nel nucleo, suggerendo la presenza di un segnale di localizzazione nucleare (NLS) all'interno di questa regione (Pitkanen J. et al., 2001). Inoltre AIRE contiene un potenziale segnale di esportazione nucleare (NES) nel dominio HSR (Homogeneously colorazione Regione) (Pitkanen J. et al., 2001).

I residui di lisina sono componenti essenziali dell'NLS di varie proteine e sono spesso acetilati. È stato dimostrato che l'acetilazione è in grado di influenzare la distribuzione nucleo/citoplasma ed è in alcuni casi indispensabile per questa azione dinamica, portando a diverse conseguenze a seconda delle proteine coinvolte.

È stato inoltre proposto che l'acetilazione delle lisine possa regolare la funzione dell'NLS influenzando le sue interazioni con le proteine responsabili della traslocazione all'interno del nucleo. L'acetilazione del dominio NLS potrebbe inoltre indurre delle modificazioni conformazionali che influiscono anche sulla funzione del segnale di esportazione nucleare e alterare quindi la distribuzione subcellulare.

I nostri risultati indicano che l'acetilazione nella regione N-terminale di AIRE, che contiene il dominio NLS, è importante per la sua localizzazione subcellulare. Con esperimenti di spettrometria di massa abbiamo individuato quattro siti di acetilazione nel dominio NLS (K102-K111-K131-K133) e abbiamo dimostrato il loro coinvolgimento nel mantenimento della corretta distribuzione nucleare di AIRE e quindi nella sua funzione biologica.

Abbiamo dimostrato inoltre che la mancata acetilazione delle lisine di AIRE (mutante K102-111-131-133R) implica una riduzione di importazione nucleare e che la sostituzione a livello delle stesse lisine con la glutamina (Q) che mima la lisina acetilata (mutante K102-111-131-133Q), ripristina una corretta localizzazione nucleare. Abbiamo inoltre valutato se la sostituzione delle sole lisine in posizione 102, non inclusa nell'NLS canonico ma fiancheggiante la regione, e 111 con la glutammina potesse essere coinvolta nel corretto trasporto di AIRE nel nucleo.

I risultati conducono ad un'incerta interpretazione. Infatti abbiamo osservato una distribuzione parziale di AIRE sia nel citoplasma e anche nel nucleo; ipotizziamo quindi che lo stato di acetilazione di tutte e quattro le lisine sia importante per il corretto posizionamento di AIRE.

Un precedente lavoro ha dimostrato che la proteina AIRE è in grado di legare CBP e p300 ed è da quest'ultima acetilata. Nei nostri esperimenti abbiamo dimostrato che AIRE può legare

pCAF, un coattivatore trascrizionale con attività acetiltransferasica. L'interazione AIRE-pCAF si traduce sia in un aumento del livello di acetilazione di AIRE, sia in un aumento della capacità di transattivazione di un gene reporter.

L'aumentata presenza di AIRE a livello nucleare che si osserva quando la proteina è acetilata può essere quindi dovuta sia ad un aumento dell'importazione o ad una diminuzione dell'esportazione. Poiché proteine acetilasiche come p300/CBP e pCAF hanno principalmente una localizzazione a livello nucleare propendiamo per la seconda ipotesi, anche se la prima non può essere esclusa.

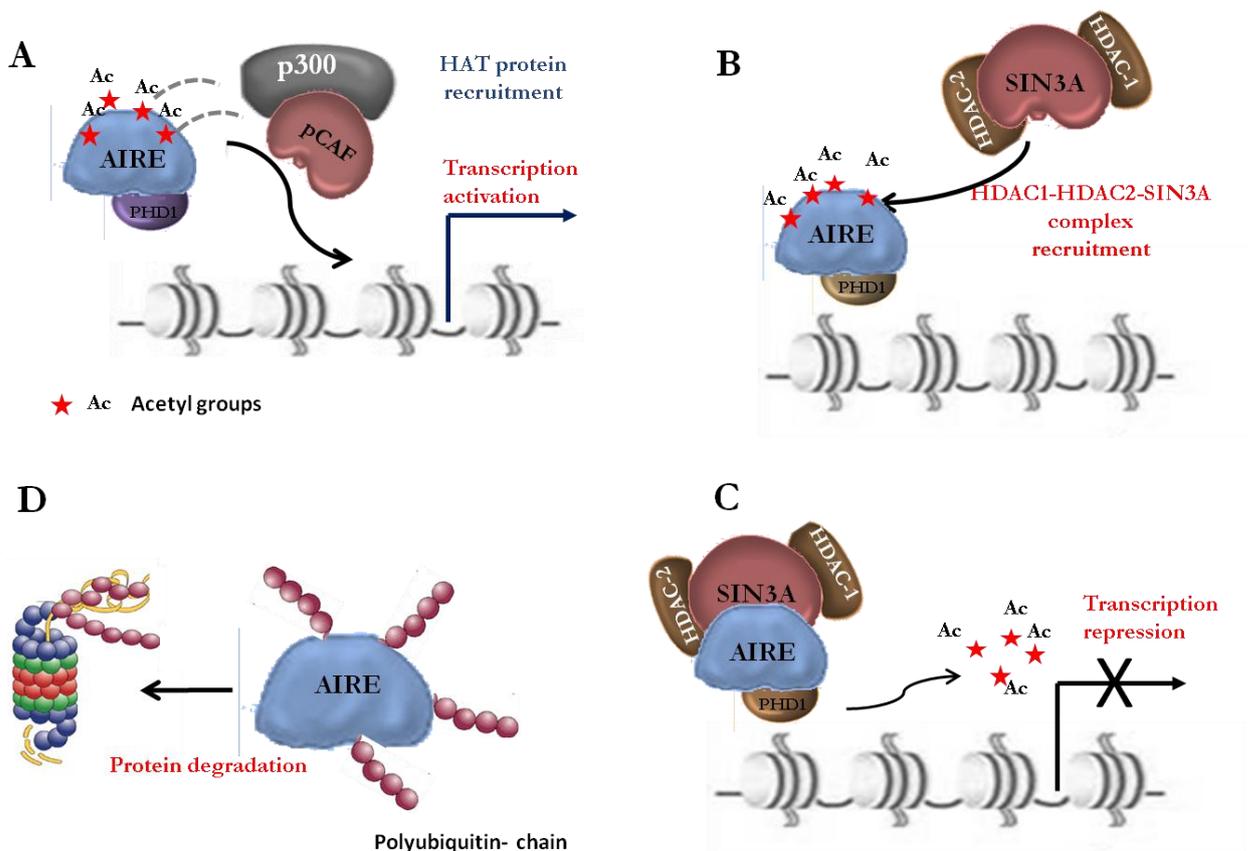
È stato dimostrato che l'acetilazione regola l'attività di numerosi fattori di trascrizione come p53, GATA 1, E2F, MYOD ed è un processo cellulare reversibile. Questi fattori di trascrizione possono essere infatti acetilati e deacetilati reversibilmente interagendo con due tipi di enzimi, istone acetiltransferasi (HATs) e istone deacetilasi (HDACs).

Partendo dai risultati precedentemente ottenuti dal nostro gruppo, che mostrano l'interazione fisica AIRE con HDAC1/HDAC2, abbiamo dimostrato che la proteina è in grado anche di interagire con Sin3A, membro del *HDAC1-HDAC2/Sin3A complex* e che questa interazione si traduce in una sua deacetilazione e in una riduzione della capacità transattivante.

Lo stato di deacetilazione è probabilmente responsabile dell'instabilità di AIRE che diventa più suscettibile alla degradazione nel proteasoma. È stato dimostrato da Aikyo et al che AIRE può funzionare come un enzima E3 dell'ubiquitilazione (Akiyoshi et al nel 2004), ed è inoltre soggetta ad ubiquitilazione da parte di altre proteine E3 ligasi. Questa condizione è compatibile con una successiva degradazione proteasoma-mediata.

Si può ipotizzare che l'acetilazione di AIRE impedisca l'accesso ai medesimi siti da parte dell'ubiquitina impedendone la degradazione.

Dopo la traduzione nel citoplasma, la proteina AIRE verrebbe importata nel nucleo e poi acetilata da pCAF/p300/CBP. Questa modificazione post-traduzionale potrebbe aumentare la stabilità della proteina e favorire il suo mantenimento nel nucleo dove la proteina acetilata sarebbe in grado di svolgere il suo ruolo di regolatore trascrizionale sui suoi specifici geni bersaglio. Un modello complessivo di queste interazioni potrebbe essere quello proposto in figura 24.



**Figura 24:** Meccanismo molecolare ipotetico proposto in questo studio per spiegare l'attività di AIRE

## Conclusione e prospettive future

Gli studi condotti in questo lavoro si sono focalizzati sulla acetilazione della proteina AIRE al fine di definirne i siti interessati, gli enzimi coinvolti e il significato funzionale. Lo studio dell'acetilazione dei fattori di trascrizione risulta di notevole importanza perché tale modificazione è in grado di influenzare la funzionalità delle proteine. Poiché l'acetilazione è un processo reversibile, una parte dello studio si è concentrata sulla deacetilazione e i suoi effetti sulla proteina.

Esperimenti di spettrometria di massa ci hanno permesso di individuare all'interno della proteina AIRE 11 lisine acetilate. I nostri studi si sono principalmente focalizzati sul dominio NLS responsabile della localizzazione subcellulare della proteina. Quattro delle sei lisine del NLS risultano acetilate (102-111-131-133) ed abbiamo dimostrato che la loro acetilazione favorisce la localizzazione a livello nucleare di AIRE e la corretta formazione nei nuclear dots. È possibile ipotizzare quindi che questa modificazione stabilizzi la proteina nel nucleo, dove essa esplica la sua azione di regolatore trascrizionale dei suoi geni target. Nei promotori dei geni target, AIRE è in grado di legare l'istone H3K4 non modificato (H3K4me0). Successivamente a questa interazione si ha un incremento della modificazione H3K4me3 e AcH3, modificazioni istoniche associate con la cromatina attiva e una diminuzione dei livelli di H3K27me3, un marcatore epigenetico associato alla repressione trascrizionale (Agger K. et al., 2008). Probabilmente AIRE è capace di reclutare specifiche HAT che portano ad una sua acetilazione e quindi ad un'attivazione trascrizionale. Tale processo sarebbe reversibile, pertanto è necessario che in uno specifico momento AIRE venga silenziata. Probabilmente

questo avviene ad opera dei membri del *HDAC1/HDAC2-SIN3A complex* che porta a repressione trascrizionale.

Gli studi sull'acetilazione di AIRE e il suo coinvolgimento nel complesso corepressorio con attività deacetilasica contribuiscono ad ampliare le nostre conoscenze sui pathways in cui AIRE è coinvolta. Ulteriori studi riguardanti altre modificazioni post-traduzionali potrebbero portare ad una migliore conoscenza di meccanismi eventualmente coinvolti nella corretta localizzazione o nella regolazione dell'attività trascrizionale di AIRE.

Ad esempio potrebbe essere ulteriormente indagato il ruolo della sumoilazione. L'attacco covalente della proteina SUMO al substrato mediata dall'azione dell'enzima E2 rappresenta una modificazione post-traduzionale notevolmente studiata. La sumoilazione ha delle caratteristiche simili all'ubiquitilazione ed è come questa evolutivamente molto conservata, tuttavia porta conseguenze notevolmente differenti.

L'ubiquitilazione è generalmente associata alla degradazione proteica proteasoma-mediata, la sumoilazione invece influisce sulla proteina bersaglio alterando la sua localizzazione subcellulare, ma entrambe competono con altre modificazioni post-traduzionali (Muller et al.,2001; Kim et al.,2002).

Nostri precedenti esperimenti ci hanno permesso di caratterizzare Ubc9, enzima E2 della sumoilazione, come partner AIRE. Ilmarinen et al nel 2008 hanno dimostrato che AIRE lega PIAS1, enzima E3 della sumoilazione. Poiché le lisine possono essere bersaglio della sumoilazione ed essendo questa modificazione notevolmente differente all'ubiquitilazione, sarebbe interessante studiare il ruolo di queste altre modificazioni che vedono coinvolti i residui di lisina, così da chiarire ulteriormente il funzionamento della proteina AIRE.

L'importanza di tali studi è legata alla peculiarità dell'APECED, che rappresenta un modello affascinante per la comprensione dei meccanismi molecolari di regolazione immunologica. La comprensione dei fini meccanismi alla base delle disregolazione immunologica presente nei pazienti APECED può dare un contributo per la comprensione anche di altre malattie autoimmuni più frequenti nella popolazione.

## Bibliografia

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

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

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

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

Anderson MS, (2002). Autoimmune endocrine disease. *Curr Opin Immunol*

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

Bannister AJ, Kouzarides T., (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*

Betterle C. et al.,(1998). Clinical review 93: Autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab*

Betterle C. et al.,(2002). Autoimmune adrenal insufficiency and autoimmune polyendocrine syndromes: autoantibodies, autoantigens, and their applicability in diagnosis and disease prediction *Endocr Rev*

Bienz M et al., (2006) .The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem Sci*

Björres P, Aaltonen J, Vikman A, Perheentupa J, Ben-Zion G, Chiumello G, Dahl N, Heideman P, Hoorweg-Nijman JJ, Mathivon L, Mullis PE, Pohl M, Ritzen M, Romeo G, Shapiro MS, Smith CS, Solyom J, Zlotogora J, Peltonen L. , (1996). Genetic homogeneity of autoimmune polyglandular disease type I. *Am J Hum Genet*.

Björres P, Pelto-Huikko M, Kaukonen J, Aaltonen J, Peltonen L, Ulmanen I., (1999). Localization of the APECED protein in distinct nuclear structures. *Hum Mol Genet*.

Björres P. et al., (2000). Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein. *Am J Hum Genet*

Blehschmidt K, Schweiger M, Wertz K, Poulson R, Christensen HM, Rosenthal A, Lehrach H, Yaspo ML., (1999). The mouse Aire gene: comparative genomic sequencing, gene organization, and expression. *Genome Res*.

Bottomley MJ, Collard MW, Huggenvik JI, Liu Z, Gibson TJ, Sattler M.,(2001).The SAND domain structure defines a novel DNA-binding fold in transcriptional regulation. *Nat Struct Biol*

Bottomley MJ, Stier G, Pennacchini D, Legube G, Simon B, Akhtar A, et al.(2005). NMR structure of the first PHD finger of autoimmune regulator protein (AIRE1) Insights into autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis- ectodermal dystrophy (APECED) disease. *J Biol Chem*

Boyes J, Byfield P, Nakatani Y, Ogryzko V., (1998). Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature*

Cihakova D. et al.,(2001). Novel AIRE mutations and P450 cytochrome autoantibodies in Central and Eastern European patients with APECED. *Hum Mutat*

Cress WD, Seto E., (2000). Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol.*

David M. Heery<sup>1</sup>, Eric Kalkhoven<sup>1</sup>, Susan Hoare<sup>1</sup> & Malcolm G. Parker<sup>1</sup>, (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*

Longwen Deng, Cynthia de la Fuente, Peng Fu, Lai Wang, Robert Donnelly, John D. Wade, Paul Lambert, Hong Li, Chee-Gun Lee, and Fatah Kashanchi, (2000). Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 Increases Transcription of Integrated HIV-1 Genome and Enhances Binding to Core Histones. *Virology*

Di Bari et al., (2006). c-Abl acetylation by histone acetyltransferases regulates its nuclear-cytoplasmic localization. *EMBO reports*

Dominguez M. et al., (2006). Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in the Irish population. *J Pediatr Endocrinol Metab*

Dornan et al., (2003). The Proline Repeat Domain of p53 Binds Directly to the Transcriptional Coactivator p300 and Allosterically Controls DNA-Dependent Acetylation of p53. *Molecular And Cellular Biology*

Dormeyer W, Ott M, Schnölzer M., (2005). Probing lysine acetylation in proteins: strategies, limitations, and pitfalls of in vitro acetyltransferase assays. *Mol Cell Proteomics*

Durrin, L.K., Mann, R.K., Kayne, P.S., and Grunstein, M., (1991). Yeast histone H4 N-terminal sequence is required for promoter activation in vivo. *Cell*

Faiola F, Liu X, Lo S, Pan S, Zhang K, Lyman E, Farina A, Martinez E., (2005). Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Mol Cell Biol*

Ferguson BJ, et al., (2008). AIRE's CARD revealed, a new structure for central tolerance provokes transcriptional plasticity. *J. Biol. Chem*

Finnish-German APECED Consortium, (1997). An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet*

Fischle W, Wang Y, Allis CD., (2003). Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond. *Nature*

Furmaniak J, Kominami S, Asawa T, Wedlock N, Colls J, Smith BR., (1994). Autoimmune Addison's disease-evidence for a role of steroid 21-hydroxylase autoantibodies in adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.*

Gibson et al., (1998).The APECED polyglandular autoimmune syndrome protein, AIRE-1, contains the SAND domain and is probably a transcription factor. *Trends Biochem Sci*

Glozak et al., (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins, *Elsevier*

Halonen M. et al., (2001). Subcellular location and expression pattern of autoimmune regulator (Aire), the mouse orthologue for human gene defective in autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED). *J Histochem Cytochem*

Halonen M. et al., (2002). AIRE mutations and human leukocyte antigen genotypes as determinants of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*

Maria Halonen, Hannele Kangas, Taina Ruppell, Tanja Ilmarinen, Juha Ollila, Meelis Kolmer, Mauno Vihinen, Jorma Palvimo, Jani Saarela, Ismo Ulmanen, and Petra Eskelin, (2004). APECED-Causing Mutations in AIRE Reveal the Functional Domains of the Protein. *Human Mutation*

Heino M. et al.,(1999). Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. *Biochem Biophys Res Commun*

Heino M. et al., (1999b). Mutation analyses of North American APS-1 patients. *Hum Mutat*

Hollenbach AD. et al., (1999). The Pax 3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax-3-associated repressor h DAXX. *The EMBO Journal*

Ilmarinen Tanja, Meleń Krister, Kangas Hannele, Julkunen Ilkka, Ulmanen Ismo and Eskelin Petra, (2005). The monopartite nuclear localization signal of autoimmune regulator mediates its nuclear import and interaction with multiple importin  $\alpha$  molecules. *FEBS Journal*

Ilmarinen Tanja, Kangas Hannele, Kytömaa Taina, Eskelin Petra, Saharinen Juha, Seeler Jacob-S., Tanhuanp Kimmo, Yih-Ling Chan Fiona, Slattery Robyn Maree, Alakurtti Kirsi, Palvimo Jorma J., Ulmanena Ismo, (2008). Functional interaction of AIRE with PIAS1 in transcriptional regulation. *Molecular Immunology*

Imhof A, Yang XJ, Ogryzko VV, Nakatani Y, Wolffe AP, Ge H., (1997 ). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr Biol*.

Hyndman et al.,(2011).Mapping acetylation sites in E2A identifies a conserved lysine residue in activation domain 1 that promotes CBP/p300 recruitment and transcriptional activation. *Biochimica et Biophysica Acta*

Kay BK, Williamson MP, Sudol M., (2000). The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J*.

Kazuhiko Kogawa, (2002). Expression of AIRE gene in peripheral monocyte/dendritic cell lineage. *Immunology Letters*

Kim KI, Baek SH, Chung CH., (2002). Versatile protein tag, SUMO: its enzymology and biological function. *J Cell Physiol*

Sprent J, Kishimoto H, Cai Z, Surh CD, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA., (1996). The thymus and T cell death. *Adv Exp Med Biol*.

Kishimoto H, Sprent J, (1997). Negative selection in the thymus includes semimature T cells. *J Exp Med*.

Klein L, Klein T, Ruther U, Kyewski B.,(1998). CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J Exp Med*.

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

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

Krohn K, Uibo R, Aavik E, Peterson P, Savilahti K.,(1992). Identification by molecular cloning of an autoantigen associated with Addison's disease as steroid 17 alpha-hydroxylase. *Lancet*.

Kumar, P. G., Laloraya, M., Wang, C. Y., Ruan, Q. G., Davoodi-Semiromi, A., Kao, K. J. and She, J. X., (2001). The autoimmune regulator (AIRE) is a DNA-binding protein. *J Biol Chem*

Kuroda N, Mitani T, Takeda N, Ishimaru N, Arakaki R, Hayashi Y, Bando Y, Izumi K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S, Ueno T, Takahama Y, Uchida D, Sun S, Kajiura F, Mouri Y, Han H, Matsushima A, Yamada G, Matsumoto M., (2005).Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of Aire-deficient mice. *J Immunol*

Lee JW., (2007).Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol*

Mathis D. and Benoist C., (2009.) "Aire," Annual Review of Immunology

Meager A. et al.,(2006). Anti-interferon autoantibodies in autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1. *PLoS Med*

Meloni, A. et al., (2002). Delineation of the molecular defects in the AIRE gene in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients from Southern Italy. *J Clin Endocrinol Metab*

Meloni, A. et al., (2005). Two novel mutations of the AIRE protein affecting its homodimerization properties. *Hum Mutat*

Meloni A et al., (2008). Role of PHD fingers and COOH-terminal 30 amino acids in AIRE transactivation activity. *Molecular Immunology*

Meloni et al., (2010). DAXX Is a New AIRE-interacting Protein. *J Biol Chem*

Mittaz L, Rossier C, Heino M, Peterson P, Krohn KJ, Gos A, Morris MA, Kudoh J, Shimizu N, Antonarakis SE, Scott HS, (1999). Isolation and characterization of the mouse Aire gene. *Biochem Biophys Res Commun*

Müller S, Hoege C, Pyrowolakis G, Jentsch S., (2001). SUMO, ubiquitin's mysterious cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol.*

Naar AM, Beurang PA, Robinson KM, Oliner JD, Avizonis D, Scheek S, Zwicker J, Kadonaga JT, Tjian R., (1998). Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev*

Nagamine K, Peterson P, Scott HS, Kudoh J, Minoshima S, Heino M, Krohn KJ, Lalioti MD, Mullis PE, Antonarakis SE, Kawasaki K, Asakawa S, Ito F, Shimizu N., (1997). Positional cloning of the APECED gene. *Nat Genet.*

Neufeld, M., Maclaren, N. and Blizzard, R., (1980). Autoimmune polyglandular syndromes. *Pediatr Ann*

Neufeld, M., Maclaren, N. K. and Blizzard, R. M., (1981). Two types of autoimmune Addison's disease associated with different polyglandular autoimmune (PGA) syndromes. *Medicine (Baltimore)*

Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y., (1996). The Transcriptional Coactivators p300 and CBP Are Histone Acetyltransferases. *Cell*

Org et al., (2008). AIRE–PHD1 finger binds to non-methylated histone H3K4 T. *European Molecular Biology Organization*

Oukka M, Cohen-Tannoudji M, Tanaka Y, Babinet C, Kosmatopoulos K, (1996). Medullary thymic epithelial cells induce tolerance to intracellular proteins. *J Immunol*

Patel JH, Loboda AP, Showe MK, Showe LC, McMahon SB, (2004). Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC. *Nat Rev Cancer*

Pearce SH. et al., (1998). A common and recurrent 13-bp deletion in the autoimmune regulator gene in British kindreds with autoimmune polyendocrinopathy type 1. *Am J Hum Genet*

Pearce SH, Cheetham TD., (2001). Autoimmune polyendocrinopathy syndrome type 1: treat with kid gloves. *Clin Endocrinol (Oxf)*

Perheentupa, J., (1980). Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). In Population structure and genetic disorders. *Academic Press*.

Perheentupa J et al., (2002). APS-I/APECED: the clinical disease and therapy. *Endocrinol Metab Clin North Am*

Perheentupa J., (2006). Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*

Pitkänen, J., Doucas, V., Sternsdorf, T., Nakajima, T., Aratani, S., Jensen, K., Will, H., Vahamurto, P., Ollila, J., Vihinen, M. et al., (2000). The autoimmune regulator protein has transcriptional transactivating properties and interacts with the common coactivator CREB-binding protein. *J Biol Chem* .

Pitkänen J et al.,(2001). Subcellular localization of the autoimmune regulator protein. characterization of nuclear targeting and transcriptional activation domain. *J Biol Chem*

Pitkänen J. et al., (2005). Cooperative activation of transcription by autoimmune regulator AIRE and CBP. *Biochem Biophys Res Commun*

Poledova and Sherman, (2002). The diversity of acetylated proteins, *Genome biology*

Rinderle C, Christensen HM, Schweiger S, Lehrach H, Yaspo ML., (1999). AIRE encodes a nuclear protein co-localizing with cytoskeletal filaments: altered sub-cellular distribution of mutants lacking the PHD zinc fingers. *Hum Mol Genet*

Rosatelli MC. et al., (1998). A common mutation in Sardinian autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients. *Hum Genet*

Ruan QG, (2007).The autoimmune regulator directly controls the expression of genes critical for thymic epithelial function. *J Immunol*

Saare Mario, Rebane Ana, Rajashekar Balaji, Vilo Jaak, Peterson Pa`rt, (2012). Autoimmune regulator is acetylated by transcription coactivator CBP/p300. *Experimental Cell Research*

Mark Saltis & Michael F. Criscitiello & Yuko Ohta & Matthew Keefe & Nikolaus S. Trede & Ryo Goitsuka & Martin F. Flajnik, (2008). Evolutionarily conserved and divergent regions of the Autoimmune Regulator (Aire) gene: a comparative analysis. *Immunogenetics*

Scott HS. et al.,(1998). Common mutations in autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy patients of different origins. *Mol Endocrinol*

Spange et al. (2009). Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol*.

Stolarski B., et al.,(2006). Molecular background of polyendocrinopathy-candidiasisectodermal dystrophy syndrome in a Polish population: novel AIRE mutations and an estimate of disease prevalence. *Clin Genet*

Strahl BD, Allis CD, (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*

Sun J, Fu H, Wu J, Zhu W, Li Y, Yang W., (2012). Macrophages overexpressing Aire induce CD4+Foxp3+ T cells. *Mol Med Rep*.

Suzuki E., Kobayashi Y., Kawano O. et al., (2008). "Expression of AIRE in thymocytes and peripheral lymphocytes," *Autoimmunity*

Yi Tang, Jianyuan Luo,Wenzhu Zhang,and Wei Gu, (2006).Tip60-Dependent Acetylation of p53 Modulates the Decision between Cell-Cycle Arrest and Apoptosis. *Molecular Cell*

Tao Y, Kupfer R, Stewart BJ, Williams-Skipp C, Crowell CK, Patel DD, Sain S, Scheinman RI., (2006).

AIRE recruits multiple transcriptional components to specific genomic regions through tethering to nuclear matrix. *Mol Immunol*

Turner BM, (2007). Defining an epigenetic code. *Nat Cell Biol*.

Uchida Daisuke, Hatakeyama Shigetsugu, Matsushima Akemi, Han Hongwei, Ishido Satoshi, Hotta Hak, Kudoh Jun,N Shimizuobuyoshi, Doucas Vassilis, Nakayama Keiichi I., Kuroda Noriyuki and Matsumoto Mitsuru, (2004). AIRE Functions As an E3 Ubiquitin Ligase. *The Journal of Experimental Medicine*

Ulmanen et al., (2005). Monogenic autoimmune diseases — lessons of self-tolerance). *Current Opinion in Immunology*

Van der Heide e Smidt, (2005). Regulation of FoxO activity by CBP/p300-mediated acetylation. *TRENDS in Biochemical Sciences*

Vervoorts J., Luscher-Firzlaff J.M., Rottmann S., Lilischkis R., Walsemann G., Dohmann K., Austen M., Luscher B., (2003). Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO journal*

Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ Jr, (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl.*

Wang, C. Y., Shi, J. D., Davoodi-Semiromi, A. and She, J. X., (1999a). Cloning of Aire, the mouse homologue of the autoimmune regulator (AIRE) gene responsible for autoimmune polyglandular syndrome type 1 (ASP1). *Genomics*

Wolff AS. et al.,(2007). Autoimmune polyendocrine syndrome type 1 in Norway: phenotypic variation, autoantibodies, and novel mutations in the autoimmune regulator gene. *J Clin Endocrinol Metab*

Yang X. et al., (1997). Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*

Yuan L Wuchao and Giordano Antonio, (2002). Acetyltransferase machinery conserved in p300/CBP-family proteins. *Oncogene*

Zlotogora J. and Shapiro MS., (1992). Polyglandular autoimmune syndrome type I among Iranian Jews. *J Med Genet*

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