

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E
SPERIMENTALI
INDIRIZZO IN SCIENZE REUMATOLOGICHE
CICLO XXVI**

TITOLO TESI

**La mutazione S59P del gene TNFRSF1A, associata alla TRAPS, causa
l'attivazione costitutiva della via del segnale NFκB**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. GAETANO THIENE

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. LEONARDO PUNZI

Supervisore :Ch.mo Prof. MARIO PLEBANI

Dottorando : ELIANA GRECO

INDICE

RIASSUNTO	pag. 5
SUMMARY	pag. 8
1. INTRODUZIONE	pag. 10
<u>1.1 RECETTORE DEL TNF (TNFR)</u>	pag.13
1.1.1 IL SIGNALLING PATHWAY DEL TNFR1	pag.14
<u>1.2 MUTAZIONI DEL GENE TNFRSF1A ASSOCIATE ALLA TRAPS</u>	pag.17
<u>1.3 PATOGENESI DELLA TRAPS</u>	pag.19
1.3.1 IPOTESI DELLA DIFFUSIONE	pag.19
1.3.2 IPOTESI DEL "MISFOLDING"	pag.20
1.3.3 IPOTESI NF-KB	pag.21
2. SCOPO DELLA TESI	pag.25
3. MATERIALI E METODI	pag.26
<u>3.1 VETTORE DI ESPRESSIONE</u>	pag.26
<u>3.2 REAZIONE DI MUTAGENESI SITO-SPECIFICA</u>	pag.27
3.2.1 DISEGNO DEI PRIMERS DI MUTAGENESI	pag.27
3.2.2 PROTOCOLLO DI MUTAGENESI SITO-SPECIFICA	pag.28
<u>3.3 TRASFORMAZIONE DI E. COLI</u>	pag.30
<u>3.4 ESTRAZIONE DEL DNA PLASMIDICO DALLE COLONIE</u>	pag.32
<u>3.5 SEQUENZIAMENTO DEI COSTRUTTI</u>	pag.32
<u>3.6 MAXI PREP</u>	pag.32
<u>3.7 CONSERVAZIONE DELLE COLTURE BATTERICHE</u>	pag.33
<u>3.8 COLTURE CELLULARI</u>	pag.33
3.8.1 TRASFEZIONE DELLA LINEA CELLULARE HEK293	pag.33
3.8.2 TRASFEZIONE STABILE	pag.36

<u>3.9 MODELLO SPERIMENTALE SULLE LINEE CELLULARI</u>	pag.36
3.9.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER ANALISI DI IMMUNOBLOT E IMMUNODOSAGGIO CITOCHINE	pag.36
3.9.2 SDS PAGE E IMMUNOBLOT	pag.37
3.9.3 IMMUNODOSAGGIO DELLE CITOCHINE PROINFIAMMATORIE	pag.37
<u>3.10 ANALISI DI IMMUNOFLUORESCENZA</u>	pag.37
3.10.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	pag.37
3.10.2 ANALISI DEI CAMPIONI MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA	pag.38
3.10.3 IMAGING	pag.39
<u>3.11 PAZIENTI</u>	pag.40
<u>3.12 SEPARAZIONE DELLE CELLULE MONONUCLEATE DA SANGUE PERIFERICO</u>	
4. BIOINFORMATICA	pag.41
<u>4.1 TRAPS GENETIC VARIANTS DATABASE</u>	pag.41
<u>4.2 CHROMAS LITE</u>	pag.41
<u>4.3 IMAGEJ</u>	pag.41
5. RISULTATI	pag.42
<u>5.1 PREPARAZIONE DEI COSTRUTTI DEL RECETTORE DEL TNF WILD TYPE E S59P, R92Q E T50M</u>	pag.42
<u>5.2 STUDI FUNZIONALI</u>	pag.44
5.2.1 ANALISI DI IMMUNOFLUORESCENZA	pag.45
5.2.2 ANALISI DELLA VIA DEL SEGNALE NFκB	pag.50
5.2.3 ANALISI DELLA PRODUZIONE DELLE CITOCHINE PROINFIAMMATORIE	pag.54
6. DISCUSSIONE	pag.62
7. BIBLIOGRAFIA	pag.67
RINGRAZIAMENTI	pag.71

A mio padre.....

RIASSUNTO

Introduzione. La sindrome associata al recettore del TNF (TRAPS) è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante a penetranza incompleta, dovuta a mutazioni del gene TNFRSF1A che codifica per il recettore tipo I del TNF (TNFR1). Dal punto di vista clinico i pazienti presentano diversi sintomi quali febbre ricorrente associata a mialgia, sintomi gastrointestinali, artriti, pericarditi e congiuntiviti. I meccanismi cellulari che caratterizzano la patofisiologia della TRAPS sono di fondamentale importanza per comprendere il meccanismo di azione del recettore del TNF. Le diverse mutazioni presenti nel gene determinano differenti comportamenti della proteina modificata che possono coinvolgere la diffusione, il folding proteico o il signalling intracellulare del recettore attivato. La maggior parte delle mutazioni sono localizzate nel dominio extracellulare (CRD) della proteina, coinvolto nel legame con il TNF α . Le mutazioni più drastiche coinvolgono i residui cisteinici ma esistono anche mutazioni ad alta penetranza che non coinvolgono questi residui, come la mutazione T50M, che determinano un quadro clinico fenotipico severo e mutazioni a bassa penetranza con quadro fenotipico più variabile come la mutazione R92Q. Di recente è stata identificata una nuova mutazione della regione codificante, c.262T>C (S59P), in un paziente adulto affetto da TRAPS che determina la sostituzione aminoacidica della serina (S) in prolina (P) in posizione 59 della proteina matura.

Scopi. Lo scopo del presente lavoro è stato studiare gli effetti di questa mutazione sulla via del segnale intracellulare del TNFR1 e confrontare i risultati con quelli ottenuti dalle mutazioni T50M e R92Q già note in letteratura.

Metodi: è stato creato un vettore contenente il cDNA Wild Type (WT) e tre vettori con le rispettive mutazioni c.262T>C (S59P), c.362G>A (R92Q) c.236C>T(T50M) mediante reazione di mutagenesi sito-diretta. I vettori sono stati inseriti nella linea cellulare Human Embryonic Kidney (HEK293) mediante trasfezione stabile e sono state ottenute quattro nuove linee cellulari HEK WT, HEK S59P, HEK R92Q e HEK T50M. Le cellule ottenute sono state stimulate con TNF α (60ng/mL) al fine di osservare la localizzazione cellulare del recettore mediante immunofluorescenza indiretta e per valutare la fosforilazione di I κ B α nel tempo, mediante analisi al western blot. Le cellule sono state stimulate per 4 ore in assenza o con TNF α a diverse concentrazioni (0.6,6,60 ng/mL) per valutare il rilascio di prodotti dell'attivazione del segnale NF κ B mediante analisi immunoenzimatica (ELISA). Sulla base dei risultati preliminari ottenuti abbiamo scelto di utilizzare la

concentrazione intermedia di TNF α a 6ng/mL per valutare il signalling NF κ B nelle cellule considerate. Dal momento che il paziente con la mutazione S59P è attualmente in terapia con anti-IL1, abbiamo utilizzato anche lo stimolo con IL1 β (1 μ g/mL) nei modelli sperimentali. Per confrontare i risultati ottenuti con il modello in vitro, abbiamo eseguito le medesime condizioni sperimentali nei PBMC isolati dal sangue periferico del paziente affetto da TRAPS con la mutazione S59P, da un paziente con la mutazione R92Q e da cinque soggetti sani privi di mutazione nel gene del recettore del TNF (W/W).

Risultati. Dall'analisi di immunofluorescenza è stato osservato che il TNF α induce un regolare "trafficking" del TNFR nelle cellule WT, mentre la presenza delle mutazioni determinano un accumulo, in forma di aggregati citoplasmatici, del recettore del TNF, all'interno delle cellule. Il TNF α e IL1 β riducevano la fosforilazione di I κ Ba nelle cellule WT, mentre nelle cellule mutate si osservava un significativo incremento della fosforilazione di questa proteina. L'attivazione e traslocazione di NF κ B si correla con quanto osservato. Nelle cellule WT gli stimoli infiammatori riducevano l'attivazione della subunità p65 di NF κ B, mentre nelle cellule mutate l'attivazione era marcatamente indotta, principalmente da TNF α ma anche da IL1 β . Lo stimolo con TNF α induceva un rilascio di IL8 significativamente più elevato nelle cellule mutate rispetto alle cellule WT. I risultati ottenuti dagli esperimenti con i PBMC dei pazienti e dei soggetti sani confermavano quanto osservato con il modello in vitro. La fosforilazione era costitutivamente aumentata nei PBMC mutati rispetto ai PBMC W/W e gli stimoli infiammatori intensificavano la fosforilazione. Lo stimolo con TNF α manteneva l'attivazione di NF κ B nei PBMC mutati, inoltre nei PBMC S59P, lo stimolo con IL1 β faceva persistere l'attivazione. LPS induceva un significativo rilascio di IL1 β , IL6, IL8 e TNF α in tutti i PBMC considerati, indipendentemente dalla mutazione. Nei PBMC del paziente con la mutazione S59P IL1 β induceva un significativo e persistente rilascio di IL6 e IL8.

Conclusioni. La nuova mutazione S59P nel gene del recettore del TNF determina una proteina con una struttura conformazionale modificata da impedire la corretta distribuzione nella cellula e risulta essere attiva anche in assenza di legame con il TNF α . La presenza di questa mutazione determina l'attivazione della via infiammatoria in maniera particolarmente accentuata e persistente. Un contesto iperinfiammatorio osservato in vitro è stato confermato anche nel

paziente con la mutazione S59P nonostante sia in terapia antiinfiammatoria. Questa mutazione inoltre sembra rendere le cellule particolarmente sensibili agli effetti dell' IL1 β sia per l'attivazione del pathway NF κ B sia per il rilascio delle citochine pro infiammatorie.

SUMMARY

Background. The TNF receptor associated periodic syndrome (TRAPS) is an autosomal dominant autoinflammatory disease due to mutations within the TNFRSF1A gene that codify the TNF receptor 1. Clinically TRAPS patients have recurrent fever associated to myalgia, gastrointestinal symptoms, arthritis or arthralgia, pericarditis and conjunctival pains. The study of the pathophysiology of TRAPS has been fundamental to understand the mechanism of action of TNFR1. Different mutations in the gene result in different aberrant functions of the protein that involve modification in the shedding or in protein folding or in intracellular signalling of TNFR1. To date up to 100 mutations are found associated to the development of TRAPS. The majority of the mutations are located within Cysteine Rich Domains (CRDs). They have a high penetrance as T50M and the phenotype is a typical TRAPS. There are other mutations that do not involve the CRDs. They have a low penetrance and are associated with a variable phenotype as R92Q. Recently in our laboratory we identified a novel mutation in TNFRSF1A gene that results in Pro for Ser amino acid substitution at residue 59 of the mature protein (S59P) in an adult TRAPS patient.

Aims. The aim of this work is to study the effects of this mutation on the signalling pathway of TNFR1 and compare the results with those obtained from high penetrance T50M and low penetrance R92Q mutation that are described in literature.

Methods. Human Embryonic Kidney (HEK293) cell line was stably transfected with a construct containing Wild-Type (WT) TNFRSF1A gene and c.262T>C (S59P), c.362G>A (R92Q) c.236C>T (T50M) TNFRSF1A mutants. The new four cell lines obtained were stimulated with TNF α (60ng/mL) to evaluate the cellular location of the TNFR1. The cells were stimulated with TNF α (60ng/mL) at different intervals to evaluate the I κ B α phosphorylation. The downstream targets of NF- κ B signalling (IL8) were measured in the supernatants (ELISAs) of all cell lines after they have been kept in culture medium alone (negative control) or stimulated for 4 hours with different concentrations of TNF α (60-6-0.6 ng/mL). Finally we chose the TNF α concentration of 6ng/mL to evaluate the NF κ B signalling by western blot in the cells. Since the S59P patient is actually in therapy with anti-IL1R, we used IL1 β (1 μ g/mL) as a stimulus to evaluate the NF κ B signalling. To compare the in vitro results, the same conditions were performed in PBMC from patients affected TRAPS with S59P and R92Q mutation and from healthy subjects.

Results. At confocal microscopy. $\text{TNF}\alpha$ caused a membranal shift of TNFR1 in WT, while it induced its cytoplasmatic accumulation in mutants. $\text{pI}\kappa\text{B-}\alpha$ was reduced by $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL1}\beta$ in WT, while in mutant we observed a significantly increase of phosphorylation of this protein. This was confirmed by activation and translocation of p65 unit, which was not observed in WT cells but marked induced in mutant cells, mainly by $\text{TNF}\alpha$ but also by $\text{IL1}\beta$. $\text{TNF}\alpha$ dose-dependently induced IL8 release, being the magnitude of increase significantly higher in mutant cells with respect to WT cells. Patients data confirmed in vitro results. The phosphorylation of $\text{I}\kappa\text{Ba}$ was constitutively increased in mutant PBMC respect to W/W. $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL1}\beta$ intensify the phosphorylation. In mutant PBMC $\text{NF}\kappa\text{B}$ activation was maintained after $\text{TNF}\alpha$ stimulus. $\text{IL1}\beta$ sustained the activation only in S59P PBMC. LPS induced a significant release of IL1b , IL6 , IL8 and $\text{TNF}\alpha$ in all PBMC. In S59P PBMC mainly IL1b induce a significant and persistent enhancement of IL6 and IL8 .

Conclusions. The novel S59P mutation, in TNFRSF1A gene cause a TNFR1 receptor defective in cellular trafficking and insensitive to ligand. The mutant receptor activated appears to induce a significant a persistent $\text{NF}\kappa\text{B}$ activation and cytokine release. In S59P TRAPS patient the $\text{NF}\kappa\text{B}$ pathway was basely activated despite treatment with anti- IL1 . This TNFR mutation appear to sensitize cells to $\text{IL1}\beta$ effects

1. INTRODUZIONE

La Sindrome Periodica Associata al Recettore del TNF (TRAPS) è una malattia genetica trasmessa come carattere autosomico-dominante a penetranza incompleta, dovuta a mutazioni del gene del recettore tipo 1 del TNF (TNFRSF1A).

Appartiene al gruppo delle malattie definite “Autoinfiammatorie” caratterizzate da episodi infiammatori recidivanti a carico di vari organi e si distinguono dalle patologie autoimmuni perché non vi è apparentemente il coinvolgimento di autoanticorpi né di autoantigeni, ma si manifestano come una disregolazione della risposta immunitaria innata.

Un sottogruppo delle malattie autoinfiammatorie definite “sindromi delle febbri periodiche”, si distingue per la ricorrenza degli attacchi febbrili, anche elevati, associati a sintomi reumatologici che coinvolgono l'apparato muscolo-scheletrico, gli occhi e la pelle (Hull KM et al 2002, Hoffman HM et al 2009, Yao Q et al. 2008, Farasat s et al 2008). L'identificazione dei geni coinvolti e delle proteine codificate ha definito ed ampliato il concetto di queste malattie

Tabella 1

Malattie autoinfiammatorie sistemiche

	GENE/ LOCUS	PRODOTTO PROTEICO	EREDITARIETA'	RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO
FMF (Febbre Mediterranea Familiare)	MEFV 16p13.3	Pirina	Autosomico Recessivo	Chae JJ. Immunity 2011
MKD (Deficienza da Mevalonato Kinasi)	MVK 12q24	Mevalonato Kinasi	Autosomico Recessivo	Ammouri W. Rheumatology 2006; Pontillo A. Eur J Hum Genet 2010
TRAPS (Sindrome periodica Associata al Recettore del TNF)	TNFRSF1A 12p13	Recettore p55 del TNF	Autosomico Dominante	McDermott MF Cell, 1999; Aganna E. Arthritis e rheumatism

				2003; Pelagatti M Arthritis e Rheumatism. 2011
FCAS (Orticaria Familiare da Freddo)	CIAS1 1q44	NLRP3	Autosomico Dominante	Lasiglie D. PloS one 2011
MWS (Sindrome di Muckle-Wells)	NLRP12 19q13	NLRP12	Autosomico Dominante	Jeru I. Proc Natl Acad Asci USA 2008; Borghini S. Arthritis Rheum 2011; Jeru I Arthritis Rheum 2011
CINCA (Sindrome Articolare Cutanea Neurologica Infantile Cronica)				
PAPAs (Pyogenic Arthritis Pyoderma Gangrenosum, Acne)	CD2BP1 15q24-25	PSTPIP1 (Proteina 1 legante l'antigene CD2)	Autosomico Dominante	Yu JW. Mol Cell 2007; Smith Ej. Curr Genom 2010.
MS (Sindrome di Majeed)	LPIN2 18p11	Lipina 2	Autosomico Recessivo	Ferguson PJ. Curr Opin Rheumatol 2007.
BS (Sindrome di Blau)	NOD2/CARD15 16q12	NOD2/CARD15	Autosomico Dominante	Kanazawa N. Blood 2005; Martin TM. Arthritis Rheum 2009

La TRAPS, nota anche come “febbre iberniana familiare”, fu descritta per la prima volta nel 1982 studiando una famiglia irlandese (il nome latino di Irlanda è Hibernia) in cui si erano manifestati i sintomi di questa patologia (Williamson LM et al. 1982). Solo alla fine degli anni 90 fu coniato il termine di malattia autoinfiammatoria e la febbre iberniana fu rinominata in TRAPS dopo la caratterizzazione della sua eziologia (McDermott MF et al. 1999).

La distribuzione sembra essere omogenea nei vari gruppi etnici (Aganna E. et al 2003.) L'età media di insorgenza della TRAPS è 3 anni ma può essere

diagnosticata anche nell' adolescenza e nell'età adulta. Gli attacchi infiammatori coinvolgono più apparati, hanno una durata media di 20 giorni e ricorrono con intervalli di tempo variabili. La complicanza più grave a cui possono andare incontro questi pazienti è l'amiloidosi di tipo AA che consiste in un deposito di materiale proteico insolubile in sede extracellulare a carico di vari organi (rene, fegato, cuore) e può portare alla perdita della funzionalità dell'organo colpito (De sanctis S. et al. 2010, Schmaltz R. et al. 2010, Rigante D, et al. 2011).

Tabella 2.

Caratteristiche cliniche della TRAPS

SINTOMI	Febbre alta (>38,5 °C)
	Monoartriti, mialgie localizzate
	Macule eritematose
	Dolori addominali
	Edema periorbitale, congiuntiviti
	pericardite
DURATA ATTACCHI	7-20 giorni
FREQUENZA DEGLI ATTACCHI	settimane-mesi
COMPLICAZIONI SECONDARIE	Amiloidosi di tipo AA
TRATTAMENTO	Glucocorticoidi, anticorpi anti-TNF α (Etenarcept), anticorpi anti-IL1receptor (Anakinra)

1.1 RECETTORE DEL TNF (TNFR)

Il recettore del TNF appartiene ad una grande famiglia di recettori transmembrana (TNFR, Fas, TRAMP, TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR6 a EDAR) che condivide i domini extracellulari ricchi in cisteina (CRD), importanti per il legame con il ligando, e una sequenza intracellulare di circa 80 aminoacidi, definita "Death Domain" (DD), necessaria per l'induzione del processo apoptotico. Esistono due tipi di recettori del TNF: il tipo 1 di 55KDa (TNFR1, CD120) costitutivamente espresso in tutti i tipi cellulari, il tipo 2 di 75KDa (TNFR2, CD120B) altamente regolato ed espresso principalmente nelle cellule del sistema immunitario. Il TNFR1 è presente sia come recettore transmembrana (mTNFR1) sia come recettore solubile (sTNFR1) dopo taglio proteolitico da parte della metalloproteinasi TACE (TNF alfa converting enzyme). Il TNFR2 è presente quasi esclusivamente come recettore transmembrana (mTNFR2) (Locksley RM. Et al. 2001, Wajant H. et al. 2003).

Il gene del TNFR1 (TNFRSF1A) è localizzato sul braccio corto del cromosoma 12 (12p13). E' costituito da 10 esoni che codificano per una proteina (monomero) di 55KDa formata da: una porzione extracellulare costituita da 4 ripetizioni ricche in cisteina (CRD); una porzione transmembrana, sede del taglio proteolitico da parte di metalloproteasi per la solubilizzazione del recettore, e una porzione intracellulare contenente i "Death Domain" (DD) con la funzione di trasdurre il segnale.

Il gene del TNFR2 (TNFRSF1B) è localizzato nel braccio corto del cromosoma 1 (1p36.22). E' costituito da 10 esoni e codifica per una proteina di 75KDa. La struttura proteica è simile a quella del TNFR1 però non contiene i DD nella regione intracellulare e ha distinte funzioni biologiche (McFarlane SM et al. 2002).

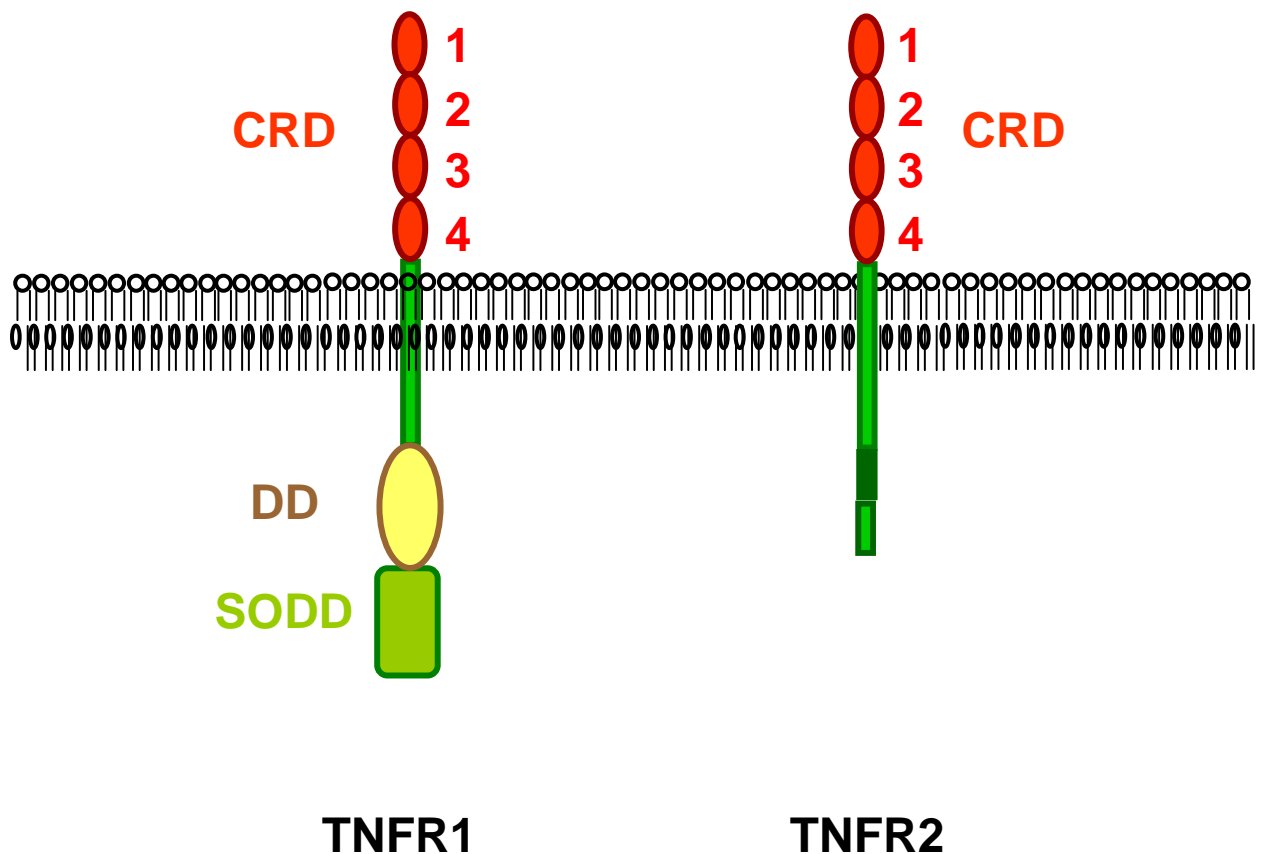


Figura 1

Struttura dei recettori TNFR1 e TNFR2

1.1.1 IL SIGNALLING PATHWAY DEL TNFR1

Il rilascio del $\text{TNF}\alpha$ in circolo determina sia l'attivazione del recettore di membrana, con l'assemblaggio di tre monomeri (omotrimerico) e la formazione della sede del legame per il ligando, sia il rilascio del TNFR in forma solubile che legandosi al $\text{TNF}\alpha$ ne attenua l'attività.

Il legame del $\text{TNF}\alpha$ al recettore di membrana innesca una serie di eventi intracellulari: 1) rilascio del dominio SODD (Silencer of Death Domain); 2) attivazione del dominio CRD1 noto anche come dominio PLADD (Pre-Ligand Assembly Domain) per la formazione dell'omotrimerico; 3) reclutamento di molecole adattatrici che si associano alla coda citoplasmatica e 4) attivazione dei DD.

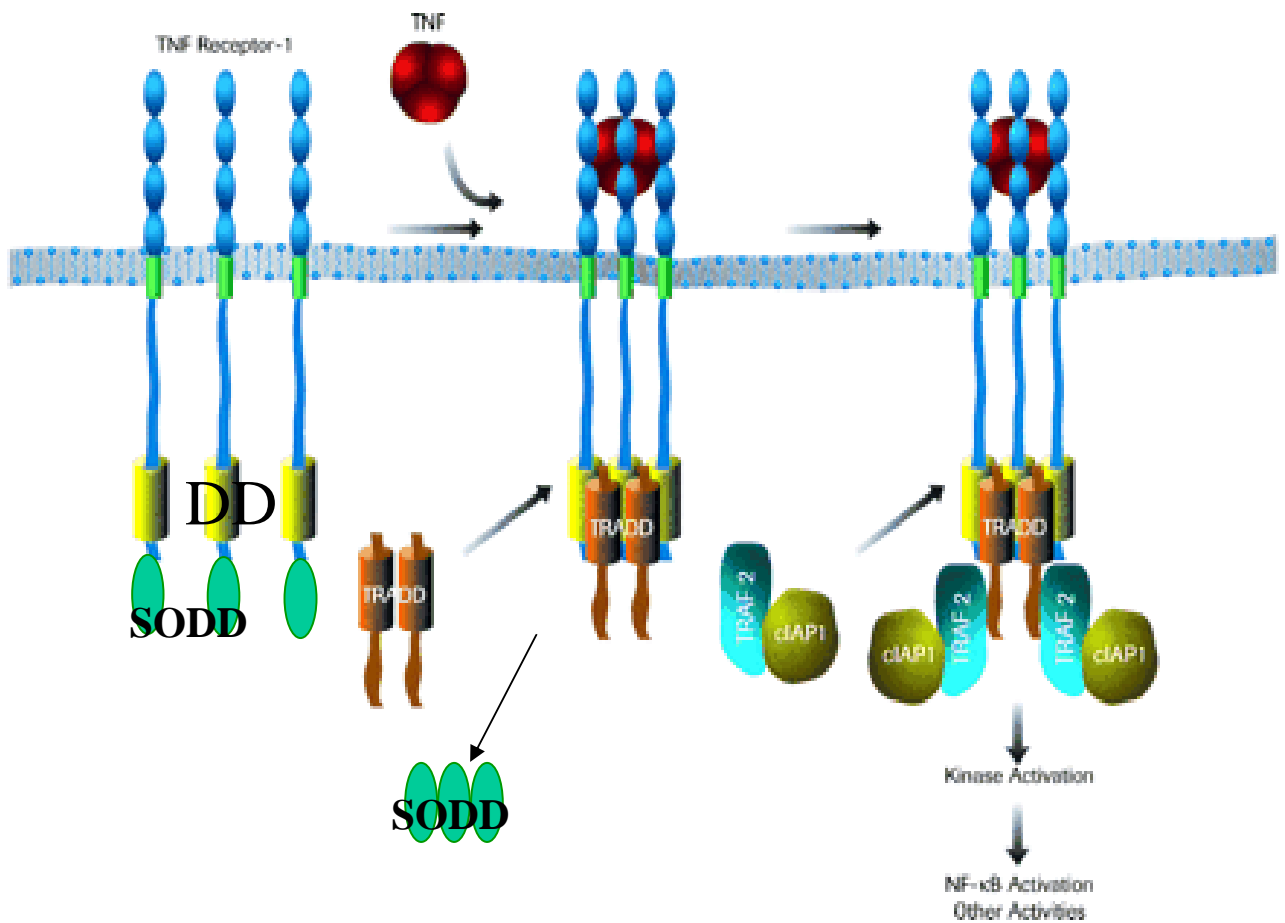


Figura 2

Attivazione del recettore del TNF dopo legame con TNF α .

Il legame recettore/ligando porta all'attivazione di 2 pathways: pathway infiammatorio e pathway apoptotico (Chen G et al 2002 , Wajant H. et al 2003, Muppidi J. Et al. 2004).

La via infiammatoria consiste nell'attivazione di NF- κ B mediante la formazione del complesso I, costituito dalle molecole TRADD (TNFR Associated Death Domain), TRAF2 (TNFR Associated Factor 2), RIP1 (Receptor Interacting Protein-1), cIAP1 e cIAP2 (cytosolic-Inhibitor of Apoptosis Protein).

RIP 1 viene ubiquitinato e attiva la I κ B α -Kinase (IKK) che fosforila l'inibitore di NF- κ B, I κ B α . La degradazione di I κ B α via ubiquitinazione-proteosoma consente la liberazione di NF κ B che può traslocare nel nucleo e iniziare la trascrizione di una serie di geni coinvolti nella sopravvivenza cellulare quali i geni anti-apoptotici: cIAP1, cIAP2, cFLIP (cytosolic-FLICE Like Inhibitor Protein) (Micheau O. et al.

2003, Stojanov S et al 2005).

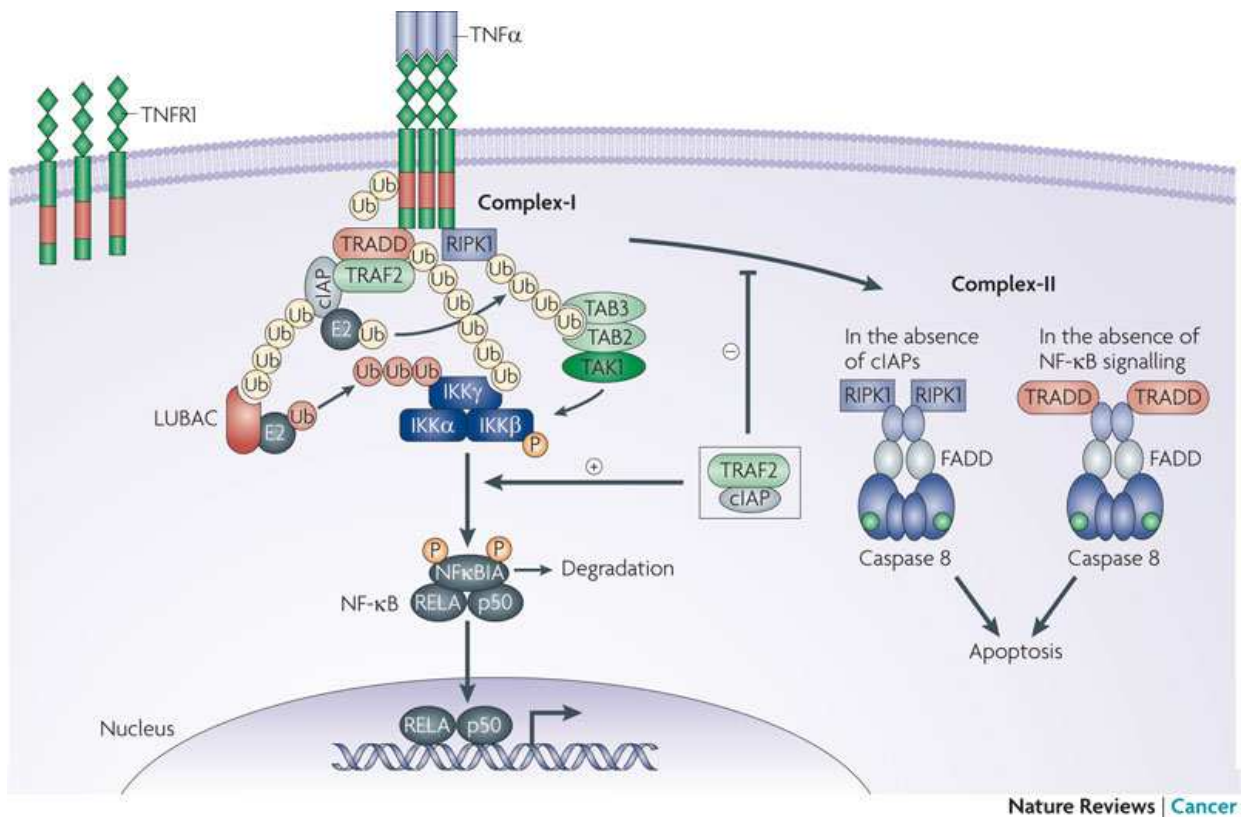


Fig 3

Attivazione dei segnali intracellulari dopo formazione del complesso recettore-ligando

Il TNFR1 e le proteine adattatrici possono andare incontro a cambi conformazionali che determinano l'internalizzazione e la formazione di un nuovo complesso detto DISC (Death Inducing Signalling Complex) o complesso II che attiva la via apoptotica.

Nel complesso II avviene il reclutamento di FADD (Fas Associated via Death Domain) da parte di TRADD ed il reclutamento della pro-caspasi 8 da parte di FADD. In questo modo la caspasi-8 viene attivata e può indurre il processo apoptotico con l'attivazione della caspasi-3.

Studi di stimolazione hanno evidenziato che il pathway infiammatorio con l'attivazione di NF- κ B risulta essere attivato più velocemente (pochi minuti) mentre

dopo un periodo più lungo (ore) avviene l'internalizzazione del TNFR1, il complesso I viene modificato da ubiquitinazione e si dissocia per formare il complesso II. Le proteine antiapoptotiche risultano comunque sintetizzate e il complesso I sembra agire da controllo (feedback negativo) per il complesso II (Muppidi JR et al 2004). Complessivamente la risposta cellulare all'attivazione del TNFR1 risulta anti-apoptica.

L' internalizzazione del TNFR1 è necessaria per trasmettere segnali pro-apoptotici dai compartimenti intracellulari, segnali pro-infiammatori ricorrono invece dal TNFR1 presente sulla superficie cellulare.

1.2 MUTAZIONI DEL GENE TNFRSF1A ASSOCIATE ALLA TRAPS

Sono state descritte più di 60 mutazioni associate al gene TNFRSF1A nel database INFEVERS. La maggior parte di queste (90%) sono mutazioni "missense" presenti soprattutto negli esoni 3 e 4 (Milhavet F. et al 2008). Quasi tutte le mutazioni sono collocate nella regione CRD (in particolare CRD1 e CRD2) ad eccezione della mutazione I170N (nell'esone 6) localizzata vicinissima al sito di taglio del recettore (Kriegel MA et al. 2003, Lehmann P. et al 2010). Il CRD1 è coinvolto nella formazione del trimero. Il CRD2 contiene la maggior parte dei residui per il legame recettore-ligando. Molte delle mutazioni coinvolgono i residui di cisteina con distruzione dei ponti di-solfuro importanti per la struttura tridimensionale e per la funzione della porzione extracellulare e sono generalmente associate ad un quadro clinico più severo della TRAPS. Esistono mutazioni che non coinvolgono i ponti di-solfuro ma i ponti idrogeno tra i loop del recettore con conseguenze sulla conformazione strutturale, come la mutazione T50M che determina una sintomatologia clinica importante anche se il rischio di amiloidosi è più basso (Aksentijevich I. et al. 2001, Hull KM et al. 2002, Pelagatti M et al. 2011).

Le mutazioni più comuni R92Q e P46L sono a bassa penetranza, non coinvolgono residui cisteinici e sembrano contribuire ad una risposta atipica nella TRAPS come dimostrato in genitori di pazienti TRAPS con la mutazione ma asintomatici e in pazienti con frequente pericardite come unica manifestazione clinica. Tutto ciò suggerisce che altri fattori genetici e/o ambientali possono avere un ruolo nell'innescare la TRAPS (Aksentijevich I. et al. 2001, Hull KM et al. 2002, Ravet N. et al. 2006, Cantarini L et al 2009, Cantarini L et al 2010, Pelagatti M et al. 2011).

I meccanismi cellulari attraverso i quali le mutazioni portano ad una sintomatologia clinica più o meno severa sono tutt'ora in fase di studio.

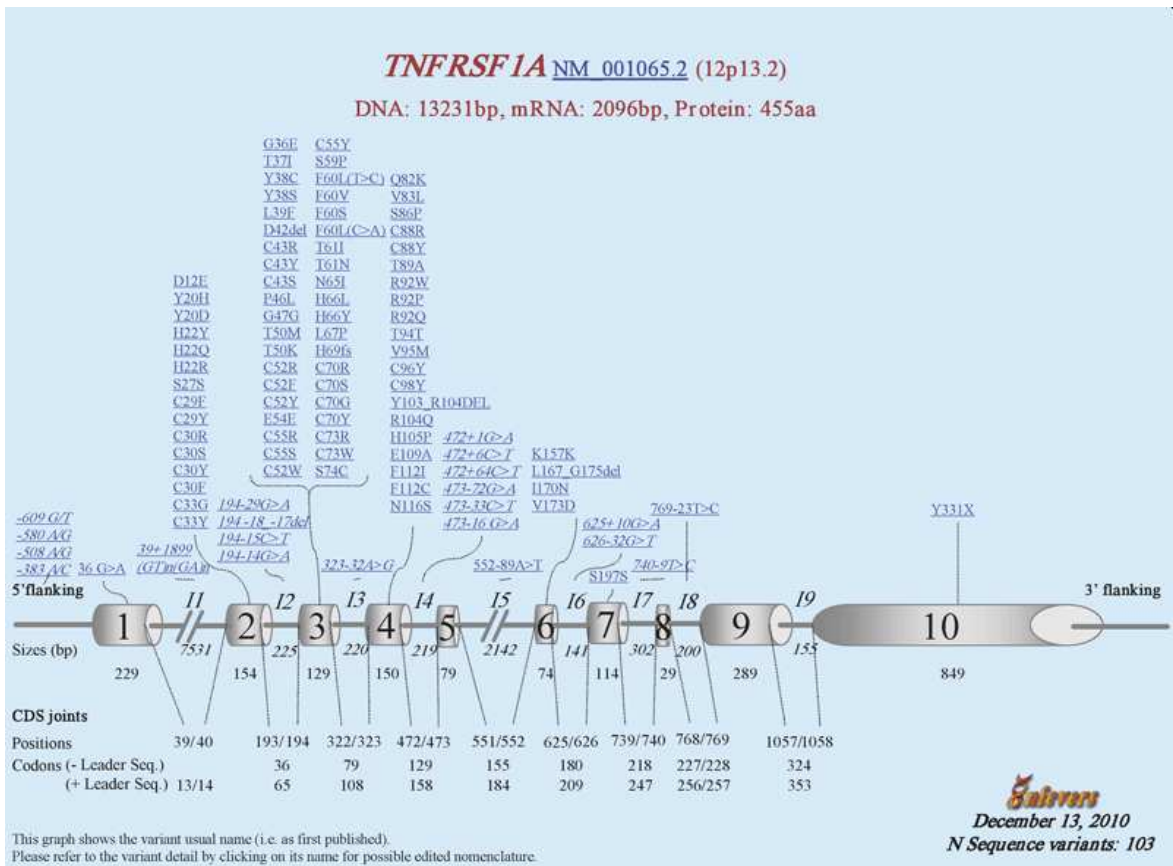


Fig 4

Elenco delle mutazioni presenti nel gene TNFRSF1A registrate nel database INFEVERS

1.3 PATOGENESI DELLA TRAPS

Il quadro clinico e le caratteristiche di laboratorio su questa patologia evidenziano nel complesso uno stato iper-infiammatorio e si potrebbe pensare che le mutazioni nel gene TNFRSF1A contribuirebbero ad una “gain-of-function” (McDermott MF et al. 1999). Studi funzionali sul TNFR mutato hanno messo in luce invece un pathway molecolare più complesso dove ci si aspetterebbe un effetto anti-infiammatorio piuttosto che pro-infiammatorio (Todd I, et al, 2004, Huggins ML et al. 2004).

Per spiegare questo apparente paradosso sono state formulate diverse ipotesi.

1.3.1 IPOTESI DELLA DIFFUSIONE

In condizioni fisiologiche la funzione del TNFR solubile è di legarsi al TNF α solubile in modo da impedire ulteriore legame della molecola al recettore di membrana e inibire così l'attività del TNF α come mediatore dell'infiammazione.

Una prima ipotesi formulata è che la proteina mutata non subisce il taglio proteolitico pertanto si ha una ridotta quantità di recettore solubile che non è in grado di neutralizzare l'attività del TNF α , venendo meno il controllo sulla infiammazione sistemica (McDermott MF et al 1999, Galon J et al 2000, Huggins ML et al. 2004). Non tutte le mutazioni sono però associate ad un difetto della diffusione del recettore e sembra essere confinato ad alcuni tipi di cellule (Huggins ML et al 2004). Risulta perciò evidente che altri meccanismi possono essere associati alla patogenesi della TRAPS.

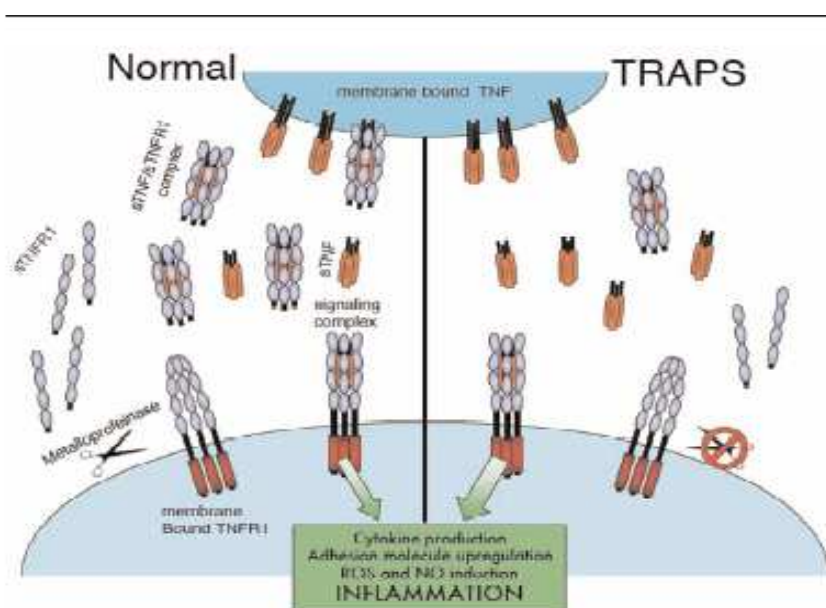


Fig 5

Meccanismo di diffusione del recettore in condizioni fisiologiche e per effetto della mutazione.

1.3.2 IPOTESI DEL “MISFOLDING”

Studi sul folding e sul trafficking pathway della proteina hanno messo in luce come diverse mutazioni del gene determinano una proteina con una conformazione modificata che non riesce a raggiungere la superficie della cellula e si accumula nel reticolo endoplasmatico (RE) causando un sovraccarico in questo organello. Gli oligomeri trattenuti nel RE possono formare trimeri a livello citoplasmatico, attivare costitutivamente, senza legame con il ligando, il signalling NF- κ B e bloccare il pathway apoptotico (Yousaf N. et al. 2005, Simon A. et al. 2010). È stato riscontrato, infatti, in neutrofili, monociti e fibroblasti di pazienti TRAPS, una diminuzione dell'apoptosi indotta da TNF α (D'osualdo A et al.2006). Una possibile conseguenza potrebbe essere una prolungata sopravvivenza delle cellule infiammatorie attivate ed una persistente risposta infiammatoria. La proteina mutata, avendo un diverso “folding”, non raggiungerà la superficie della cellula pertanto non contribuisce a formare il pool solubile che antagonizza l'azione del TNF α (Todd I et al 2004, Todd I et al 2007, Lobito AA et al 2006, Rebelo SL. et al. 2006).

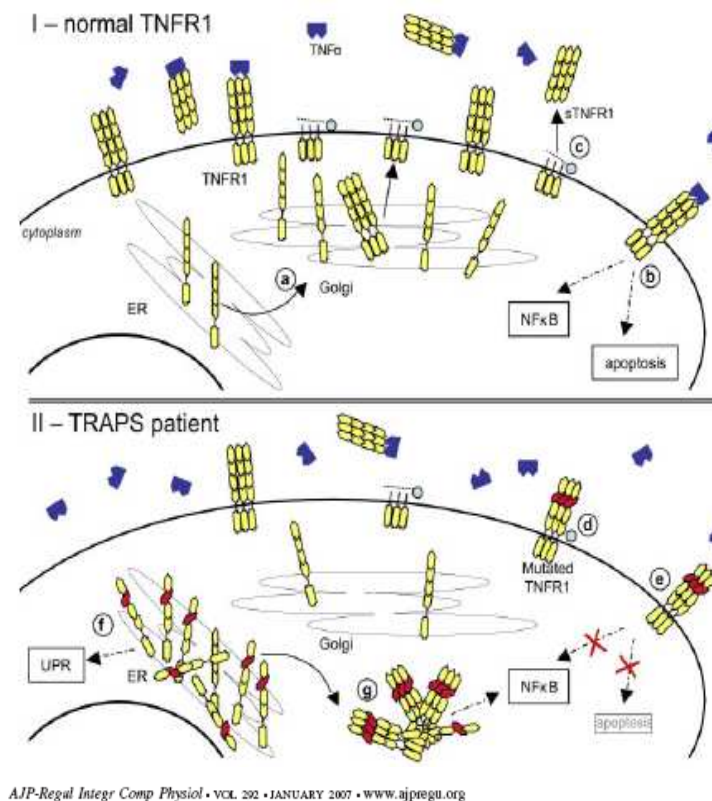


Fig 6

Schema ipotesi della diffusione del retore WT e mutato.

1.3.3 IPOTESI NF-KB

NF- κ B è un complesso proteico costituito dalla combinazione di cinque sub-unità monomeriche: p65 (relA), RelB, c-Rel, p105/p50 e p100/p52. Le sub-unità sono caratterizzate da una sequenza di 300 aminoacidi detta “Rel Homology Domain” (RHD), localizzata nella regione N-terminale, contenente una sequenza di localizzazione nucleare (NLS), responsabile della dimerizzazione e del legame con il DNA. Le sub-unità p100 e p105 contengono una regione ricca in Glicina (GGG) seguita da ripetizioni di ankirina, presenti anche nelle proteine I κ B. (Ghosh S. et al. 1998) .

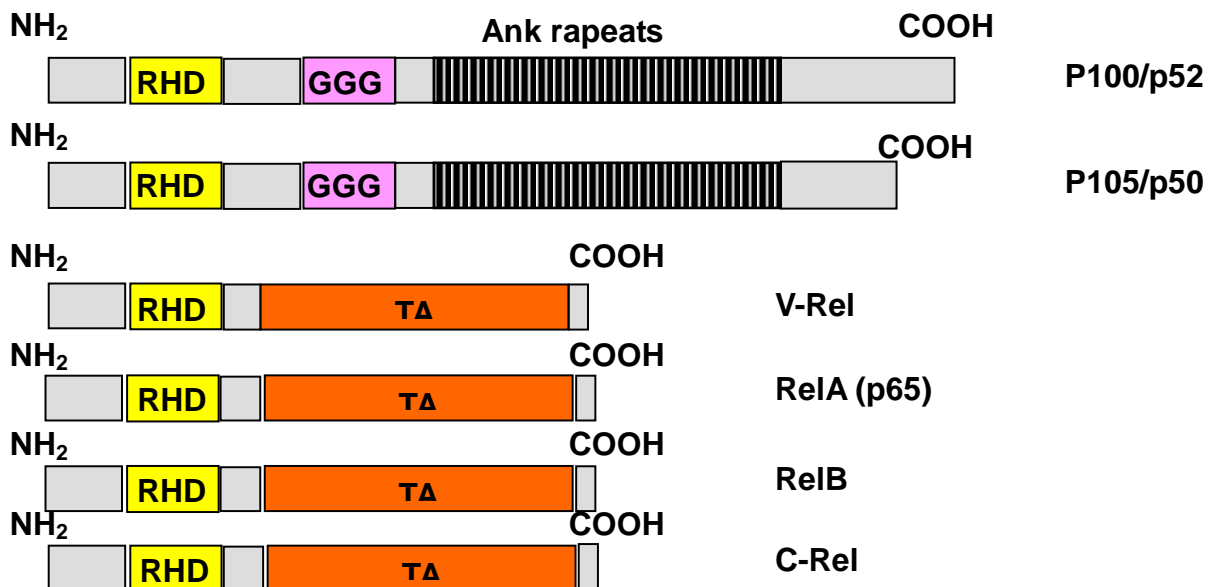


Fig 7

Architettura delle proteine NF κ B

Il complesso NF- κ B è presente nel citoplasma in forma inattiva attraverso l'interazione con le proteine della famiglia I κ B che ne impedisce la traslocazione nel nucleo. Esistono due vie di attivazione di NF- κ B: la via classica e la via alternativa. La stimolazione da parte di citochine pro infiammatorie, come TNF α , innesca la via classica con attivazione del complesso I κ B-Kinasi (IKK), formato da

IKK α -IKK β -IKK γ , che fosforila I κ B α . I κ B α fosforilato viene rapidamente (pochi minuti) poliubiquitinato e degradato dal complesso ubiquitina-proteosoma. Il dimero NF- κ B (p50/p65) è libero di traslocare nel nucleo dove riconosce e si lega a specifiche sequenze del promotore dei geni bersaglio quali: geni che codificano per citochine proinfiammatorie, per molecole di adesione, regolatori dell'apoptosi. La via alternativa porta all'attivazione dell'omodimero IKK α -IKK α che attiva il dimero NF- κ B p52/RelB il quale trasloca nel nucleo e regola l'espressione di geni coinvolti nello sviluppo di organi linfoidi secondari e dell'immunità adattativa (May MJ et al. 1997, Bonizzi G, et al. 2004, Schmitz ML et al. 2004, Hayden MS et al 2004, Moynagh PN 2005, Viatour P. TREND in Biochimicak Sci 2005, Zhou Z. et al. 2007, Ganef C. et al. 2011).

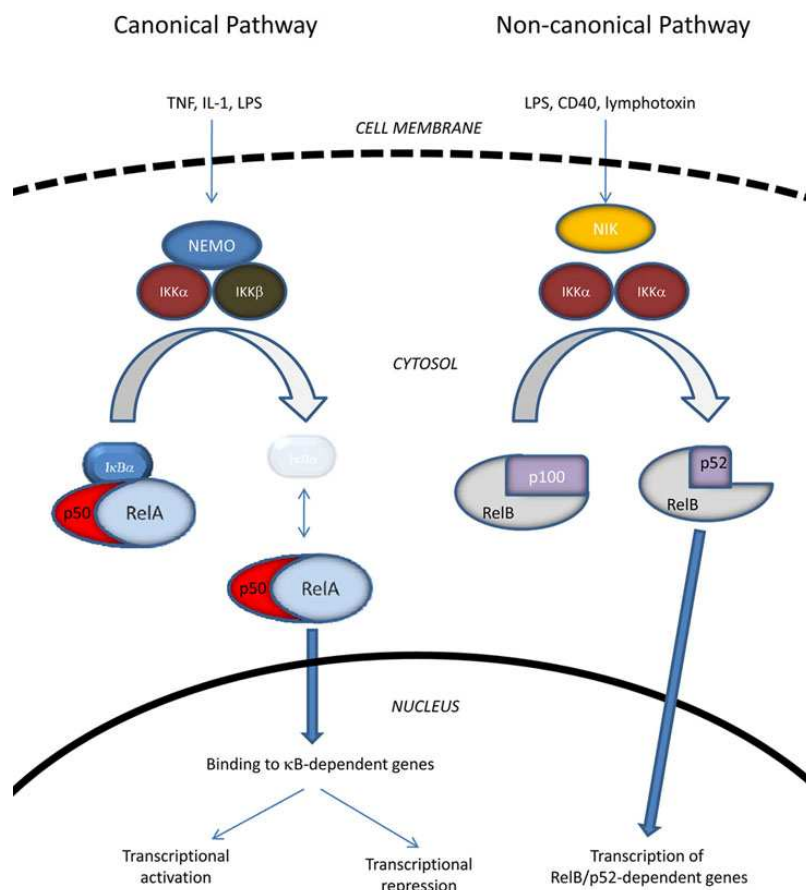


Fig 8

Pathway classico e alternativo di NF κ B

Studi genetici di “knocked-out” su topo hanno sottolineato i ruoli delle diverse subunità di NF- κ B. In particolare p65 (relA) ha un ruolo cruciale nella risposta immunitaria innata: infatti topi deficienti in questa subunità risultavano essere maggiormente suscettibili alle infezioni (Alcamo E et al. 2001).

Diversi studi funzionali, utilizzando cellule di pazienti con le diverse mutazioni nel gene TNFRSF1A e cellule trasfettate con il gene WT e mutato, hanno rilevato l'importanza del ruolo di NF- κ B nella trasmissione del segnale indotto dal legame TNF-recettore. Studiando le mutazioni sia ad alta che a bassa penetranza (C73R, T50K, P46L e R92Q) per il gene TNFRSF1A associato a TRAPS è stato osservato, sia a livello basale che dopo stimolo con TNF α , un aumento dell'attività delle varie subunità di NF- κ B: in particolare, l'attività della subunità p65 era aumentata in presenza della mutazione C73R ed era associata ad alti livelli di IL-8; l'attività della subunità p50 era aumentata in presenza della mutazione R92Q ed era associata ad alti livelli di IL-6 (Nedjai B. et al 2008, Nedjai B. et al 2011).

Recentemente nel nostro laboratorio è stata identificata una nuova mutazione missense nell'esone 3 del gene TNFRSF1A (c.262T>C) in un paziente affetto da TRAPS manifestatasi in età adulta. La sintomatologia clinica era compatibile con la patologia (febbre, leucocitosi, ricorrenti broncopolmoniti, artralgia, mialgia, lesioni eritematose cutanee e un episodio di pericardite). Dall'analisi di sequenza del gene è stata caratterizzata una mutazione nucleotidica in eterozigosi. La mutazione risulta nella sostituzione di una serina in una prolina del residuo 59 della proteina matura (p.S59P) localizzata nel dominio extra cellulare 2 (CRD2). La Serina (S) è un amminoacido polare e il suo gruppo laterale presenta un gruppo ossidrilico. La Prolina (P) è un amminoacido apolare e il suo gruppo laterale si chiude sull'atomo di azoto formando una struttura ciclica. E' l'unico amminoacido ad avere un gruppo amminico secondario. Nelle proteine la Prolina, data la sua conformazione, impedisce alla catena poli peptidica di formare eliche di tipo α .

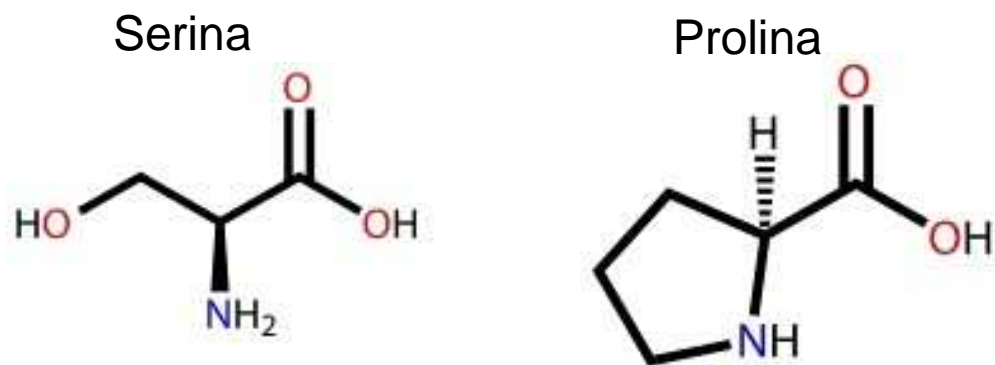


Fig 9

Struttura molecolare degli amminoacidi Serina e Prolina a confronto

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi è stato:

1. valutare l'effetto della mutazione c.262T>C del gene TNFRSF1A, che porta alla variazione aminoacidica S59P nella proteina TNFR1, sulla via del segnale intracellulare;
2. confrontare la risposta ottenuta con quella di mutazioni, note in letteratura e localizzate nello stesso dominio, ad alta penetranza c.236C>T (p.T50M) e a bassa penetranza c.362G>A (p.R92Q).

3. MATERIALI E METODI

Per analizzare gli effetti funzionali della variazione c.262T>C (p.S59P) nel gene TNFR1, identificata nel nostro laboratorio, sono stati eseguiti degli esperimenti *in vitro*. A questo scopo sono stati preparati costrutti plasmidici, contenenti rispettivamente questa variante e altre due varianti missenso già note in letteratura, c.236C>T (p.T50M) e c.362G>A (p.R92Q), partendo da un vettore di espressione eucariotico contenente il cDNA umano wild type (WT) del gene TNFR1. Tale vettore permette l'espressione della proteina in cellule di mammifero.

3.1 VETTORE DI ESPRESSIONE

Il vettore di espressione utilizzato in questo lavoro è un vettore commerciale derivato da pCVM6-AC (OriGene Technologies, Inc. Rockville, MD USA) pCMV6-AC (5,8 Kb) contenente il cDNA del TNFR1 WT con cui effettuare una trasfezione stabile in cellule eucarioti.

Il vettore contiene i seguenti siti: il promotore **CMV** che permette una forte espressione della sequenza genica presente a valle; il sito di policonnaggio per l'inserimento del cDNA; l'origine di replicazione **SV40** per la replicazione in cellule di mammifero; il gene per la resistenza alla Neomicina (**Neo**); l'origine di replicazione **ColE1** per la replicazione in cellule batteriche; il gene per la resistenza all'Ampicillina (**Amp**); l'origine di replicazione **fi-ori** per la replicazione fagica.

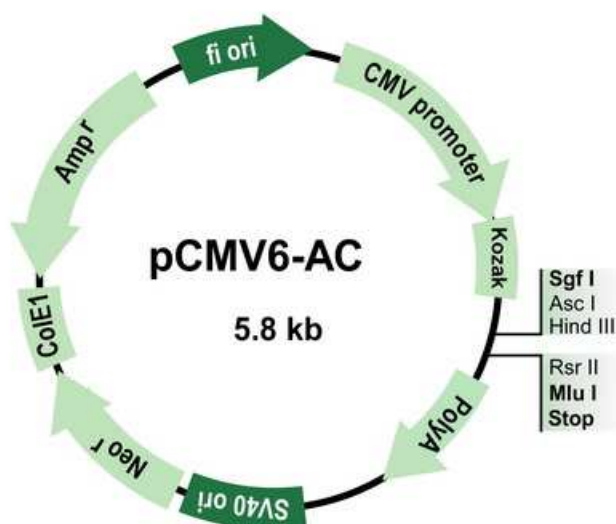


Fig.10

Struttura del vettore di espressione pCMV6-AC

3.2 REAZIONE DI MUTAGENESI SITO-SPECIFICA

Dal momento che le alterazioni della sequenza del DNA si possono tradurre in un alterato prodotto proteico, allo scopo di analizzare eventuali effetti sul fenotipo provocati dalla mutazione identificata, sono stati eseguiti esperimenti di mutagenesi sito-specifica. Si tratta di una metodica che permette di produrre in un gene mutazioni in una specifica posizione della sequenza di DNA. La metodica consente l'inserzione di variazioni nucleotidiche puntiformi oppure l'inserzione o la delezione di brevi sequenze nucleotidiche. Ai fini di questo procedimento è necessario conoscere l'esatta sequenza della regione del DNA da modificare. Il metodo utilizzato fa uso della PCR. Nel procedimento vengono utilizzati primers che contengano tale variazione nucleotidica.

3.2.1 DISEGNO DEI PRIMERS DI MUTAGENESI

I primers di mutagenesi sono stati disegnati secondo linee guida specifiche riportate di seguito:

- ⤴ La variazione da inserire deve trovarsi all'interno del primer, compresa tra due regioni di 15-18 mer.
- ⤴ La lunghezza del primer non deve superare le 45 mer (per evitare la formazione di strutture secondarie), né essere inferiore alle 25 mer.
- ⤴ La temperatura di melting (T_m) non deve essere superiore a 78°C.
- ⤴ La sequenza deve presentare un contenuto di GC intorno al 40%.
- ⤴ La sequenza deve terminare con una o più basi G o C.

Per il calcolo della T_m si utilizzano le seguenti formule.

Per inserzioni /delezioni:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\text{GC}\%) - (675/N)$$

N: lunghezza del primer (escluse le basi inserite/delete)

Per l'inserimento di variazioni puntiformi:

$$T_m = 81.5 + 0.41(\text{GC}\%) - (675/N) - \% \text{mismatch}$$

Nella tabella 3 sono riportati i primers di mutagenesi utilizzati in questo lavoro.

Tab.3 Primers di mutagenesi

In verde la variazione nucleotidica c.262T>C (p.S59P)

In viola la variazione nucleotidica c.362G>A (p.R92Q)

In azzurro la variazione nucleotidica c.236C>T (p.T50M)

PRIMER	SEQUENZA NUCLEOTIDICA
TNFR-Forward S59P	5'AGTGTGAGAGCGGC C CCCTTC ACCGCTTCAG3'
TNFR Reverse S59P	5'CTGAAGCGGTGAAGG G GCCG CTCTCACACT3'
TNFR-Forward R92Q	5'CTTCTTGACACAGTGGACC A G GACACCGTGTGTGGCTG3'
TNFR-Reverse R92Q	5'CAGCCACACACGGTGTCC T G GTCCACTGTGCAAGAAG3'
TNFR-Forward T50M	5'CCAGGCCCGGGGCAGGAT T GGACTGCAGGGAGTGTGAG3'
TNFR-Reverse T50M	5'CTCACACTCCCTGCAGTCC A T ATCCTGCCCGGGCCTGG3'

I primers Forward e Reverse, per ogni variante considerata, sono stati testati separatamente e in condizioni di annealing differenti (62°-64°-66°-68°) al fine di scegliere il primer e la temperatura ottimale per ottenere una maggior resa di mutagenesi.

3.2.2 PROTOCOLLO DI MUTAGENESI SITO-SPECIFICA

Come descritto sopra, per mutagenizzare il cDNA umano WT di TNFR1, è stato usato l'impianto sperimentale della PCR.

La mix di PCR, per campione, era la seguente:

Pfu Buffer 10X	2,5uL
dNTPs (10mM)	1uL
Primer F o R (100uM)	5uL
Pfu (2,5U) (Agilent Technology, USA)	1uL
Acqua	12,5uL
DNA template (300ng)	3uL
VOLUME TOTALE	25uL

Il protocollo per la reazione di mutagenesi

FASE DI REAZIONE	TEMPERATURA	TEMPO
Hot start	95°C	3'
Denaturazione	95°C	30''
Annealing	T _{ann} °C*	1' e 30'' X23V
Estensione	68°C	18'
Estensione finale	62°C	20'
Blocco reazione	15°C	Over-Night

*=temperatura di annealing specifica per il primer di mutagenesi in uso

Al termine della reazione di amplificazione, il prodotto di PCR, per definizione privo di metilazione, è stato digerito con una endonucleasi di restrizione (Dpn I: 1 µL) per 2 ore a 37°C.. Questo procedimento elimina selettivamente il DNA parentale emimetilato o metilato e quindi non mutagenizzato.

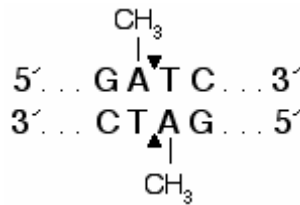


Fig. 11

Sito di restrizione di DpnI

3.3 TRASFORMAZIONE DI E. COLI

Il DNA ottenuto dalla digestione con Dpn I è stato utilizzato per trasformare un ceppo di E.coli chimicamente competente (One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli - Invitrogen, Milano, Italia).

Sono state trasformate rispettivamente con il vettore pCMV6-AC contenente il cDNA umano di TNFRSF1A WT e con il prodotto della reazione di mutagenesi.

Per massimizzare l'efficienza di trasformazione, il DNA plasmidico deve presentarsi privo di fenoli, etanolo, proteine e detergenti.

Il protocollo è il seguente:

- Aggiungere 1–5 µl di DNA plasmidico direttamente all'aliquota di cellule (50 µl). Le cellule di E. coli competenti sono molto sensibili ai cambiamenti di temperatura o alla lisi meccanica. Pertanto è utile lavorare in ghiaccio e, dopo l'aggiunta del DNA, miscelare il tutto con delicatezza.
- Incubare in ghiaccio per 30 minuti e in seguito 30 secondi in un bagnetto a 42 °C.
- Trasferire in ghiaccio per 2 minuti e aggiungere poi 250 µl di medium SOC pre-riscaldato a temperatura ambiente. Il medium SOC è un terreno ricco, necessario ai batteri durante lo step di recovery a seguito dello shock termico (composizione: Tryptone 2% w/v, Yeast extract 0.5% w/v, NaCl 8.6 mM, KCl 2.5 mM, MgSO₄ 20 mM, Glucose 20 mM).
- Miscelare a 225 rpm per 1 ora a 37°C.
- In petri pre-riscaldate a 37°C, contenenti 20 ml di terreno LB con agar e ampicillina (50 µg/ml), piastrare 20–200 µl della miscela in SOC in modo da ottenere colonie ben separate tra loro.
- Capovolgere le piastre petri e incubare a 37°C O/N.

3.4 ESTRAZIONE DEL DNA PLASMIDICO DALLE COLONIE

Dalla semina dei batteri competenti in terreno solido, sono state ottenute delle colonie. Alcune di queste colonie sono state seminate in terreno liquido LB con ampicillina, per espandere i batteri in modo monoclonale. Il DNA plasmidico di ciascuna preparazione è stato estratto con il kit GeneElute™ Plasmid Miniprep Kit PLN70 (Sigma, Milano, Italia), adatto ad estrazioni da piccoli volumi (miniprep).

Il protocollo usato è il seguente:

Tecnica GeneElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma, Milano, Italia)

Il kit offre un metodo semplice, rapido e conveniente per l'isolamento di DNA plasmidico ricombinante da colture di *E. coli*. La combinazione tra la tecnologia del legame su supporti in silice e la comodità di una colonna compatta, permette di recuperare fino a 15 µg di DNA plasmidico partendo da 1-5 ml di terreno di coltura liquido.

- Recuperare il pellet di *E. coli* mediante centrifugazione ($\geq 12000 \times g$ per 1 minuto).
- Risospendere il pellet in 200 µl di Resuspension Solution contenente Rnase A, che assicura la degradazione di molecole di RNA rilasciate nel successivo passaggio di lisi.
- Aggiungere 200µl di Lysis Solution per permettere la lisi cellulare e mescolare gentilmente per inversione 6-8 volte.
- Precipitare i residui cellulari, le proteine, i lipidi e il DNA genomico aggiungendo 350µl di Neutralization/Binding Solution, mescolando gentilmente per inversione 4-6 volte e centrifugando alla massima velocità (14.000 $\times g$ per 10 minuti).
- Trasferire il lisato in una GeneElute Miniprep Binding Column, inserita in un tubo da microcentrifuga e centrifugare a $\geq 12000 \times g$ per 30 sec – 1 min, scartando l'eluato.
- Per evitare contaminazioni del DNA plasmidico da parte di nucleasi, è opportuno fare un lavaggio della colonna con 500µl di Optional Wash Solution. Centrifugare a $\geq 12000 \times g$ per 30 sec – 1 min e scartare l'eluato.
- Un ulteriore lavaggio con 750µl di Column Wash Solution, diluita in un opportuno volume di etanolo, permette la rimozione di sali residui e altri contaminanti.

- Centrifugare a $\geq 12000 \times g$ per 30 sec – 1 min e scartare l'eluato.
- Per rimuovere l'eventuale eccesso di etanolo, centrifugare alla massima velocità per 1-2 minuti, senza ulteriori aggiunte di soluzioni di lavaggio.
- Previo trasferimento della colonna in un nuovo tubo da microcentrifuga, aggiungere 100 μ l di Elution Solution e centrifugare a $\geq 12000 \times g$ per 30 sec – 1 min. L'eluato ottenuto contiene il DNA plasmidico ed è pronto per l'uso o può essere conservato a -20°C .

3.5 SEQUENZIAMENTO DEI COSTRUTTI

Per verificare la correttezza del processo di mutagenesi sito-specifica, i costrutti sono stati sequenziati. I campioni sono stati sequenziati dal servizio di sequenziamento BMR Genomics, che utilizzano sequenziatori della serie ABI Prism, utilizzando 350 ng di vettore purificato da miniprep e 3,2 pmoli di primer specifico per la regione di interesse. I primers utilizzati per il sequenziamento sono riportati in tabella 4.

Tab.4

Primer di sequenziamento utilizzati per l'analisi dei costrutti finali.

PRIMER	SEQUENZA NUCLETIDICA
TNFR-1F	5'CCTGGACAGACCGAGTCCCG3'
TNFR-1R	5'CTATCTCTCTTCTCCCTGTC3'
TNFR-2F	5'TAATTGATTTGCTGTACCA3'
TNFR-3F	5'GCAGGAAGAACCAGTACCGG3'
TNFR-4F	5'GTTAAGGGCACTGAGGACTC3'
TNFR-5F	5'TCCACCTTCACCTCCAGCTC3'
TNFR-6F	5'CCGTTGCGCTGGAAGGAATT3'
TNFR-7F	5'CATCGAGGAGGCGCTTTGCG3'

3.6 MAXI PREP

Il DNA plasmidico dei costrutti, dopo verifica della sequenza, è stato utilizzato per trasformare nuovamente cellule competenti di E. coli come prima descritto. Le cellule trasformate sono state espanse in 200 mL di terreno LB liquido contenete

ampicillina in modo da ottenere grandi quantità di materiale (maxi prep). I plasmidi sono stati estratti con il kit PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Milano, Italia) che permette di ottenere DNA plasmidico purificato per successivi esperimenti di trasfezione in cellule eucarioti e di espressione *in vitro*. L'utilizzo di colonne preparative con membrana di silice velocizza la purificazione rispetto ai tradizionali metodi di centrifugazione su gradiente di cloruro di Cesio. Inoltre, la soluzione di lavaggio "Endotoxin Removal Wash", permette la rimozione dell'endotossina di E. coli che avrebbe effetti tossici sulle cellule eucarioti. Da 200 mL di terreno liquido LB si riescono ad ottenere 100-200µg di DNA.

Il protocollo è il seguente:

- Centrifugare la coltura a temperatura ambiente a 5000 xg per 10 minuti e rimuovere il surnatante.
- Risospendere il pellet in 3 ml di Cell Resuspension Solution e aggiungere 3 ml di Cell Lysis Solution, mescolando delicatamente per inversione 3-5 volte.
- Dopo incubazione per 3 minuti a temperatura ambiente, bloccare la lisi aggiungendo 5 ml di Neutralization Solution, mescolando delicatamente per inversione 5-10 volte.
- Centrifugare il lisato a temperatura ambiente, a 15000 xg per 15 minuti.
- Trasferire il surnatante, contenente il plasmide, in una colonna PureYield™ Clearing Column opportunamente assemblata. È importante in questa fase non trasferire in colonna anche parte del pellet, per evitare l'occlusione della membrana.
- Applicare il vuoto e attendere che tutto il lisato fluisca attraverso la colonna.
- Aggiungere 5ml di Endotoxin Removal Wash e applicare il vuoto per far fluire la soluzione attraverso la colonna.
- Aggiungere 20ml di Column Wash Solution e far fluire applicando il vuoto.
- Completare l'asciugatura della membrana di binding, applicando il vuoto per 30 sec- 1 min per eliminare i residui di etanolo.

Eluire il DNA plasmidico, in un tubo da microcentrifuga di 1.5ml, facendo fluire 400 – 600µl di acqua Nuclease-Free attraverso la colonna (applicare il vuoto per 1 minuto).

3.7 CONSERVAZIONE DELLE COLTURE BATTERICHE

Le colture di E. coli possono essere congelate in terreno LB liquido con glicerolo al 20% e l'antibiotico di selezione, per consentire il mantenimento nel tempo dei vettori plasmidici in esse contenute (glycerol stock). Il campione viene conservato a -80°C.

Per il congelamento si procede come descritto sotto:

- Inoculare 5-10 ml di medium LB liquido con ampicillina da una singola colonia cresciuta in piastra o da una goccia di sospensione di E. coli se si parte da un terreno liquido. Far crescere over-nigth a 37 °C.
- Trasferire 0.80 ml della coltura in un tubo sterile ed aggiungere 0.20 ml di glicerolo sterile. Agitare delicatamente per inversione.
- Congelare immergendo le provette in etanolo raffreddato con ghiaccio secco per alcuni minuti. Conservati a -80 °C.

Quando necessario, sarà sufficiente prelevare una piccola quantità di campione con un puntale o un'ansa sterile e farlo crescere O/N in agitazione a 37°C in LB liquido contenente l'antibiotico di selezione.

3.8 COLTURE CELLULARI

Per gli esperimenti di trasfezione è stata usata la linea cellulare umana di rene embrionale "Human Embrionic Kidney" (HEK293) che presenta una bassa espressione del recettore I del TNF ed è facilmente trasfettabile. Le cellule vengono mantenute in coltura in terreno Dulbecco Modificato (DMEM high glucose) addizionato con 10% siero fetale bovino (FCS), 2% Glutamina e gentamicina 0,1% (invitrogen, Milano, Italia) fino al momento dell'utilizzo. Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C con 5% CO₂.

3.8.1 TRASFEZIONE DELLA LINEA CELLULARE HEK293

La trasfezione consiste nel trasferimento di DNA esogeno in cellule animali o vegetali mediante tecniche fisiche o chimiche. Questo DNA può essere trattenuto nella cellula per un determinato periodo di tempo, variabile dalle 24 alle 72 ore (trasfezione transiente), o può integrarsi in modo stabile nel genoma ed essere trasmesso alle cellule figlie (trasfezione stabile).

Per la trasfezione è stato utilizzato un sistema chimico che utilizza Lipofectamine

2000 (Invitrogen, Milano, Italia). A tale scopo, 200.000 cellule sono state seminate in pozzetti da 35 mm di diametro contenenti 2mL di DMEM high glucose ed FCS al 10%. Il terreno deve essere privo di antibiotici.

Dopo 24 ore, 4µg di DNA plasmidico sono stati aggiunti, in presenza di lipofectamine, alle cellule per 6 ore. Al termine, il terreno è stato sostituito.

3.8.2 TRASFEZIONE STABILE

Le cellule trasfettate con i vettori contenenti TNFRSF1A nella versione WT e mutata sono state selezionate sostituendo, dopo 48 ore, il medium di coltura con uno contenente 0.8 mg/mL di G418 (Invitrogen, Milano, Italia). La G418, un analogo della neomicina (NEO), consente di selezionare le cellule trasfettate con un plasmide che conferisca loro resistenza all'antibiotico. Mantenendo la selezione con G418 per almeno 15 giorni si ottengono cellule trasfettate in modo stabile in cui il plasmide si è integrato nel genoma cellulare. Il terreno è stato sostituito ogni 3 giorni. Le cellule sopravvissute sono state stabilizzate come nuove linee cellulari: HEK-WT, HEK-S59P, HEK-R92Q, HEK-T50M.

3.9 MODELLO SPERIMENTALE SULLE LINEE CELLULARI

La linea cellulare HEK293 e le nuove linee HEK-WT, HEK-S59P, HEK-R92Q, HEK-T50M sono state stimulate con o senza TNF α (6ng/mL) o IL-1 β (1ng/mL) per 10 minuti. Le cellule così trattate sono state utilizzate per lo studio delle vie del segnale intracellulare mediante immunoblot.

3.9.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER ANALISI DI IMMUNOBLLOT E IMMUNODOSAGGIO CITOCHINE

Per lo studio delle vie del segnale intracellulare, le cellule HEK-293 e HEK-WT, HEK-S59P, HEK-R92Q, HEK-T50M sono state seminate (6×10^5) in piastre Petri del diametro di 10 cm e mantenute in coltura nel loro terreno completo per 24 ore. Dopo stimolazione come prima descritto, le piastre Petri sono state immediatamente trasferite in ghiaccio. Le cellule sono state quindi lavate con PBS freddo, risospese in 100 µL di Buffer di Lisi freddo [20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X 100, 50 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, 1 mM Na₃VO₄, 10% protease inhibitor cocktail (Sigma- Aldrich, Milano, Italy)] e incubate per 10 minuti. I lisati sono stati raccolti e centrifugati per 15 minuti a 16000 rpm a 4°C. La concentrazione delle proteine del surnatant è stata determinata tramite il

metodo di Bradford (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia).

3.9.2 SDS PAGE E IMMUNOBLOT

Per ogni campione, 40 µg di proteine sono state caricate su un gel SDS-PAGE al 4-12% NuPAGE® Novex Bis-Tris o NuPAGE® 3-8% Tris-Acetate (Invitrogen) e separate mediante elettroforesi secondo il protocollo indicato dal produttore (Invitrogen). In seguito le proteine sono state trasferite su membrana di Nitrocellulosa (iBlot® Transfer Stack, Invitrogen) tramite iBlot™ Dry Blotting System (Invitrogen). Le membrane sono state poi incubate per 1 ora in blocking buffer [5% latte in polvere a basso contenuto di grassi in PBS-T (PBS più 0,1% Tween 20)]. In seguito le membrane sono state incubate per 24 ore a 4°C con l'anticorpo primario [anticorpi usati: TNFR, pIKKa/b (Ser^{176/180}), pIKB-α (Ser³²), pNF-kBp65 (Ser⁵³⁶)] (Cell Signaling, Milano, Italia) diluiti in blocking buffer. Dopo un lavaggio PBS-T per 15 minuti, la membrana è stata incubata con l'anticorpo secondario anti-rabbit (diluizione 1:5000) o anti-mouse (diluizione 1:80000) coniugato con fosfatasi alcalina (Cell Signaling, Milano, Italy). L'immunoblot è stato in seguito lavato per 3 volte in PBS-T per 15 minuti e rilevato aggiungendo ECL-Advance Western Blot Detection Kit con lastre fotosensibili (Hyperfilms) (GE Healthcare Technologies, Milano, Italy).

3.9.3 IMMUNODOSAGGIO DELLE CITOCHINE PROINFIAMMATORIE

In esperimenti paralleli le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (200X10³/pozzetto) e il giorno seguente sono state stimolate con TNFα e IL1β per 4 ore come prima descritto. Dopo la stimolazione sono stati raccolti i surnatanti, centrifugati e conservati a -20°C per il dosaggio della citochina pro-infiammatoria IL-8.

3.10 ANALISI DI IMMUNOFLUORESCENZA

Lo scopo di questa tecnica è di analizzare tramite immunofluorescenza la localizzazione cellulare del recettore del TNF (TNFR) nella forma WT o recante una delle tre variazioni S59P, R92Q o T50M.

3.10.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Le cellule HEK293 e HEK-WT, HEK-S59P, HEK-R92Q, HEK-T50M sono state seminate (3x10⁵) in vetrini precedentemente sterilizzati e inseriti in piastre da 6

pozzetti. Le cellule sono state mantenute in coltura nel loro terreno completo per 24 ore prima di iniziare la sperimentazione. Il giorno seguente le cellule sono state quindi stimulate con o senza TNF α per 1 ora. Dopo la stimolazione, da ogni pozzetto è stato eliminato il terreno ed è stato eseguito un lavaggio con PBS.

Le cellule sono state successivamente fissate con formaldeide al 4% per 10 minuti per preservarle e stabilizzarle mantenendone inalterata l'organizzazione strutturale, proteggerle da eventuali danni osmotici e impedire la solubilizzazione dell'antigene. La formaldeide, inoltre, facilita l'accesso all'anticorpo primario. Dopo un lavaggio in PBS e i vetrini possono essere analizzati in immunofluorescenza o conservati a 4°C fino a 48 ore.

3.10.2 ANALISI DEI CAMPIONI MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA

Le cellule fissate sono state analizzate mediante immunofluorescenza indiretta, Come anticorpo primario è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale di topo ANTI-HUMAN CRI/TNFRSF1A-PE (RD Systems Inc.), specifico nel riconoscere il recettore TNFR di membrana. Come anticorpo secondario è stato utilizzato l'anticorpo di topo anti-human igG₁ coniugato con il fluorocromo Alexa Fluor 488 (invitrogene, Milano, Italia.) che ha un massimo di emissione alla lunghezza d'onda di 519 nm.

I vetrini, dopo lavaggio con PBS fresco per 30 secondi, sono stati incubati con 1 mL di cloruro di ammonio (NH₄Cl 50mM) per 10 minuti e, in una successiva incubazione, con 1mL di tritonX100 (0.1%) per 5 minuti. Questo trattamento crea delle aperture di membrana che permettono agli anticorpi di raggiungere il bersaglio cellulare.

Si esegue quindi un lavaggio delicato con PBS e successivamente, si effettua un'incubazione con PBS+BSA1% (Albumina Siero Bovino) per 45 minuti per mascherare i siti aspecifici a cui l'anticorpo potrebbe legarsi falsando i risultati.

Su ogni vetrino viene aggiunto 100uL di anticorpo primario, diluito 1:100 con PBS+BSA1%. L'incubazione è protratta per 1 ora a temperatura ambiente.

Si eseguono successivamente 3-4 lavaggi con PBS di 5 minuti ciascuno per eliminare eventuali residui di anticorpo primario e successivamente vengono aggiunti 100uL di anticorpo secondario (diluito 1:200 con PBS+BSA1%) per 1 ora a 37°C. In fine si eseguono 3 lavaggi in PBS di 5 minuti ciascuno per eliminare l'eccesso di anticorpo secondario.

Ciascun vetrino viene montato con un vetrino portaoggetti da microscopio

aggiungendo una goccia di soluzione di DAPI (4',6-Diamidino2-phenylindole) diluito 1:10000 che intercalando le basi di DNA colora di blu i nuclei delle cellule. I vetrini possono essere conservati al buio a 4°C.

3.10.3 IMAGING

Per visualizzare la fluorescenza emessa dal campione ed evidenziare la localizzazione cellulare del recettore del TNF WT e delle tre varianti, sono stati utilizzati dapprima il microscopio ottico a fluorescenza (Leika 5000) e in seguito il microscopio confocale con ottiche a fluorescenza (Radiance 2000, BioRad, Milano, Italia).

Un comune microscopio ottico non è di per sé predisposto per uno studio accurato di oggetti tridimensionali, in quanto fornisce generalmente un'immagine bidimensionale, che consiste nella sovrapposizione di regioni del campione su piani diversi; permette però di osservare i nuclei, colorati di blu con il DAPI. Caratteristica della microscopia confocale è invece la possibilità di dare immagini in alta qualità, scansionando il campione punto per punto grazie ad un raggio laser. La tecnica è utile per mettere a fuoco singoli piani del campione tridimensionale, rigettando la luce proveniente dalle regioni fuori fuoco esterne a questo piano. Raccogliendo le immagini di più sezioni ottiche, è possibile ricostruire a computer una nitida immagine bi- o tridimensionale del campione esaminato.

3.11 PAZIENTI

Per confrontare i risultati ottenuti in vitro con le cellule trasfettate sono state isolate le cellule mononucleate da sangue periferico di un paziente di sesso femminile di 39 anni, affetto da TRAPS, con la mutazione R92Q e le cellule di un paziente di sesso maschile di 49 anni, affetto da TRAPS, con la mutazione S59P. Entrambi i pazienti afferiscono alla UOC di Reumatologia dell'Università di Padova. Sono inoltre state analizzate le cellule mononucleate di 5 soggetti di controllo sani, privi di mutazione nel gene TNFRSF1A comparabil per età e sesso (3 maschi, 2 femmine, età 40 ± 10 anni). Da ciascun paziente e da ciascun controllo è stato ottenuto un campione di sangue EDTA utilizzato per la separazione delle cellule mononucleate.

3.12 SEPARAZIONE DELLE CELLULE MONONUCLEATE DA SANGUE PERIFERICO

Le cellule mononucleate (PBMC) del sangue periferico sono state isolate attraverso stratificazione su Ficoll/Hypaque (F/H). Tale metodo sfrutta la diversa densità delle cellule mononucleate rispetto agli altri elementi del sangue. Infatti, linfociti, monociti e piastrine, avendo una densità minore, si concentrano sopra lo strato di F/H; al contrario i globuli rossi (RBC) ed i granulociti, caratterizzati da una maggiore densità rispetto al F/H, si raccolgono sul fondo della provetta. Il sangue periferico viene prima diluito 1:2 con una soluzione sterile di sodio cloruro 0,9% (soluzione fisiologica) a temperatura ambiente. In seguito, il sangue diluito viene stratificato lentamente sopra la soluzione di F/H. Si procede quindi con una centrifugazione a 2500 rpm per 30 minuti a temperatura ambiente. Successivamente si preleva l'anello di cellule mononucleate formatosi all'interfaccia con il F/H. Queste ultime vengono sottoposte a due lavaggi successivi con soluzione fisiologica per eliminare gli elementi contaminanti (piastrine); centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti ed infine risospese in 1 ml di soluzione fisiologica.

3.13 MODELLO SPERIMENTALE SU CELLULE MONONUCLEATE (PBMC)

Le cellule mononucleate estratte da sangue periferico dai pazienti e dai soggetti sani sono state seminate (5×10^6) in piastre Petri e mantenute in coltura, per 24 e 72 ore, con RPMI 1640 addizionato con Gentamicina 0.1%, FCS al 10%, L-Glutamina 1%. Le cellule sono state stimulate senza o con $\text{TNF}\alpha$ 6ng/mL o $\text{IL1}\beta$

1ng/mL per 10 minuti. In esperimenti paralleli i PBMC sono stati seminati (5×10^3) in piastre da 24 well e sono stati stimolati per 4 ore con o senza LPS (1mg/mL) o con gli stimoli sopra citati. Dopo la stimolazione i PBMC presenti nelle Petri sono stati processati per l'analisi di immunoblot come descritto precedentemente per le cellule HEK293 in coltura. Dopo quattro ore i surnatanti dei PBMC presenti nelle piastre sono state raccolti, centrifugati e conservati a -20°C per il dosaggio delle citochine pro-infiammatorie IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α .

4. BIOINFORMATICA

4.1 TRAPS GENETIC VARIANTS DATABASE (<http://fmf.igh.cnrs.fr/ISSAID/infevers/>)

É un database di pubblico accesso contenente dati genotipici e fenotipici relativi alle variazioni nucleotidiche trovate nei geni implicati nella patologia TRAPS. Le informazioni di carattere clinico e genetico raccolte, sono corredate inoltre dalla rispettiva letteratura di riferimento.

4.2 CHROMAS LITE (<http://technelysium.com.au>)

E' un programma di visualizzazione degli elettroferogrammi ottenuti dal sequenziamento diretto. Consente di visualizzare una sequenza alla volta e di identificare l'eventuale presenza di doppi picchi.

4.3 IMAGEJ (Image Processing and Analysis in Java)

Progettato originariamente dalla NIH Image per Mac, attualmente è un software freeware che consente di visualizzare, elaborare, analizzare e salvare immagini in differenti formati. Il programma supporta la visualizzazione e l'elaborazione delle immagini correlate dal punto di vista spaziale in una sola finestra. In questo lavoro, è stato utilizzato per l'elaborazione di immagini acquisite tramite microscopia ottica a fluorescenza e microscopia confocale. E' possibile inoltre sottoporre ad analisi densitometrica i risultati ottenuti dalle immagini acquisite tramite sviluppo dei western blots. Da ciascuna banda densitometrica viene confrontata l'area di interesse e rapportata all'area della banda del corrispondente controllo.

5. RISULTATI

5.1 PREPARAZIONE DEI COSTRUTTI DEL RECETTORE DEL TNF WILD TYPE E S59P, R92Q E T50M

Parte iniziale per lo studio *in vitro* degli effetti funzionali delle tre variazioni missenso selezionate in questo lavoro (S59P, R92Q e T50M), è stata l'ottenimento di costrutti contenenti il cDNA umano del recettore del TNF WT e mutato.

Il vettore contenente il cDNA del TNFRI umano WT (pCMV6-AC) è stato acquistato ed era pronto per la trasfezione stabile in cellule di mammifero.

Successivamente sono state eseguite le reazioni di mutagenesi del cDNA TNFRI WT. Sono stati testati separatamente due primers (Forward e Reverse) per le variazioni c.262T>C (S59P), c.362G>A (R92Q) c.236C>T(T50M). La temperatura ottimale per ciascun primer è stata inizialmente ricercata in un gradiente di temperatura da 60°C a 68°C, sulla base delle condizioni di amplificazione descritte precedentemente.

Dalle prove eseguite, è stata osservata una resa maggiore di mutagenesi utilizzando i primers reverse e una temperatura di "annealing" più alta (rispettivamente 62-66-68°C)

Per verificare l'avvenuta mutazione, è stata eseguita una reazione di digestione con l'enzima di restrizione DpnI che taglia i siti metilati presenti solo nel DNA parentale.

Il prodotto ottenuto dovrebbe presentare la banda relativa al DNA mutato più una serie di bande a più basso peso molecolare relative a frammenti di digestione del DNA parentale. Il prodotto non digerito presenta solo la banda relativa al DNA in assenza di mutazione

Nella fig 12 viene riportata il risultato della digestione dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio al1%.

I prodotti selezionati sono stati trasformati in *E. Coli* per ottenere un' elevata replicazione del plasmide. Infine Il risultato della mutagenesi è stato verificato mediante sequenziamento diretto dell'inserito presente nel vettore replicato.

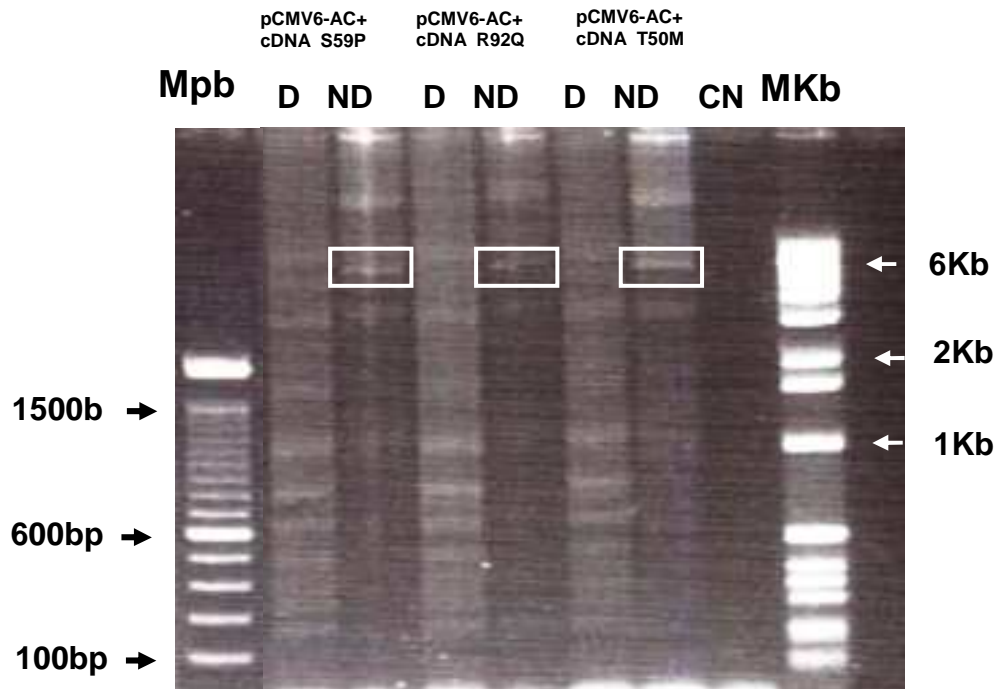


Fig 12

Separazione elettroforetica in gel di agarosio all'1% (p/V) delle restrizioni del vettore contenente il cDNA del recettore del TNF WT e recante la mutazioni S59P, R92Q, T50M.

Nei riquadri sono evidenziate le bande relative al vettore non digerito (6000bp) o digerito con l'enzima DpnI.

D= campione digerito; ND= campione non digerito; CN= controllo negativo Mbp= marker da 100bp; MKb= marker da 1Kb;

5.2 STUDI FUNZIONALI

Nella seconda parte di questo lavoro è stata effettuata l'analisi funzionale degli effetti che le tre mutazioni del gene TNFRSF1A possono avere utilizzando un modello in vitro.

I costrutti con l'inserto WT o le tre varianti missenso, sono stati fatti esprimere mediante trasfezione stabile nella linea cellulare HEK-293, facilmente trasfettabile e caratterizzata da una bassa espressione del recettore del TNF.

5.2.1 ANALISI DI IMMUNOFLUORESCENZA

Sulle cellule trasfettate è stato eseguito un saggio di immunofluorescenza indiretta per visualizzare la localizzazione cellulare del recettore del TNF WT e mutato sia in assenza sia in presenza di stimolo con TNF α ad una concentrazione molto elevata (60ng/mL) per una migliore osservazione della risposta del recettore

Nella fig 13 sono riportati i risultati dell'analisi al microscopio confocale eseguito sulle cellule HEK-293 trasfettate con il vettore WT o mutato.

Nei pannelli A,B,C,D sono visualizzate nell'ordine il recettore di membrana WT, il recettore con le rispettive mutazioni S59P, R92Q e T50M in assenza di stimolo, mentre nei pannelli A1,B1,C1,D1 sono visualizzati nel medesimo ordine i recettori WT e mutati dopo stimolo con TNF α 60ng/mL.

Dai pannelli in assenza di stimolo si osserva una debole espressione del recettore WT o con le mutazioni S59P e R92Q. Al contrario, Le cellule con il recettore recante la mutazione T50M presentano un' intensa espressione del TNFR1 localizzato esclusivamente nel citosol.

Dai pannelli con stimolo con TNF α si osserva un' aumentata espressione del recettore WT (A1), localizzata quasi esclusivamente a livello della membrana. L'espressione del recettore recante la mutazione S59P (B1) e R92Q (C1) era moderatamente aumentata e localizzata soprattutto nel citosol. Nelle cellule con il recettore recante la mutazione T50M (D1) l'espressione veniva mantenuta di intensità ma quasi unicamente nel citosol.

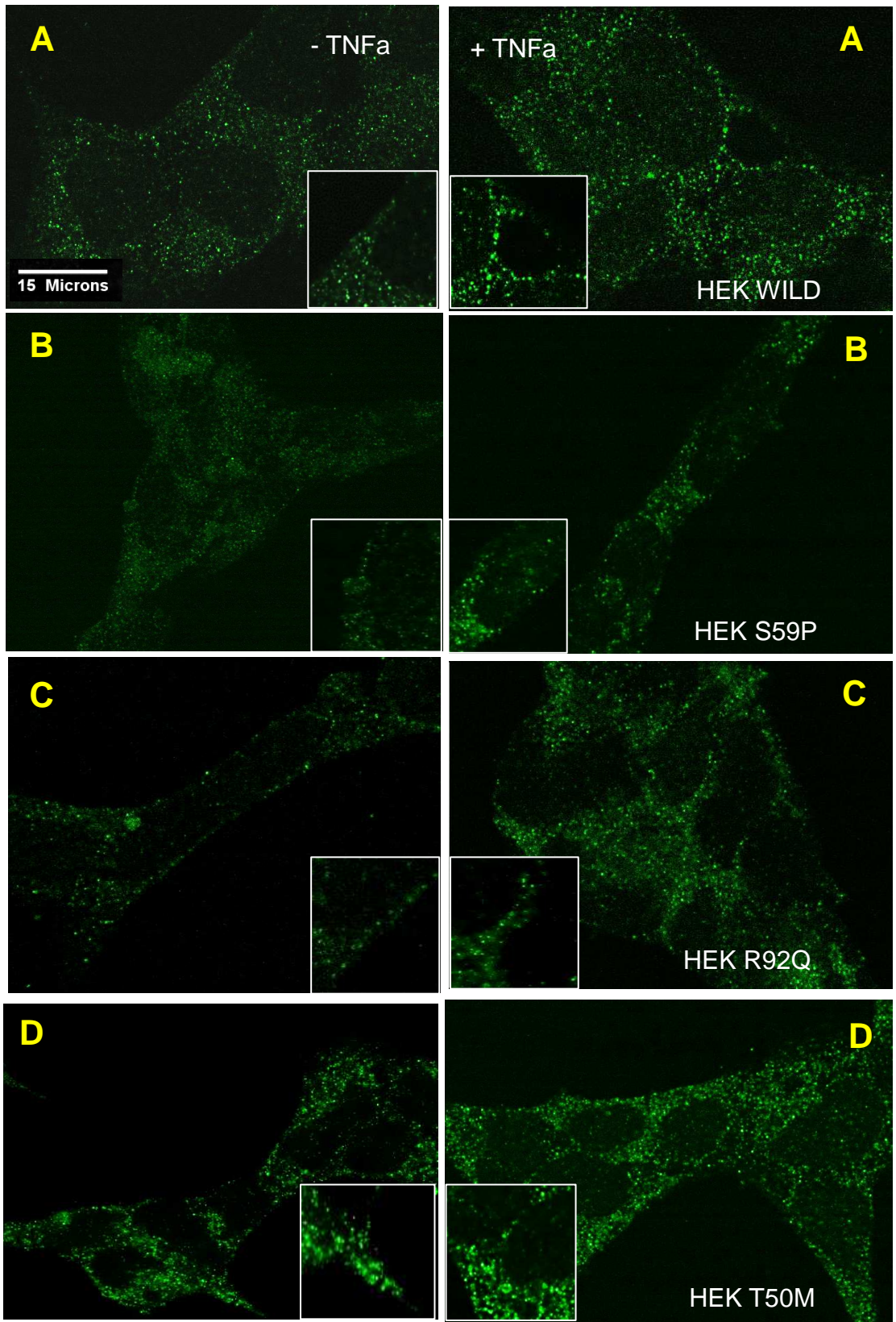


Fig 13

Analisi al microscopio confocale delle cellule HEK-293 trasfettate con i costrutti contenenti i cDNA del recettore del TNF WT (pannello A e A1), con la mutazione p.S59P (pannello B e B1), con la mutazione p.R92Q (C e C1), con la mutazione p.T50M (pannello D e D1) stimolate e non con TNFa (60ng/mL) per 60 minuti.

Per approfondire lo studio della diversa risposta allo stimolo con $\text{TNF}\alpha$ delle 4 linee cellulari studiate, le stesse sono state stimolate con alte dosi di $\text{TNF}\alpha$ (60 ng/mL) fino a 60 minuti ed è stato analizzato il grado di fosforilazione di $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ dopo 10, 20 30 e 60 minuti dallo stimolo. La figura 14 riporta i risultati western blot di $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ e i relativi valori densitometrici espressi in percentuale rispetto al controllo non stimolato. L'induzione della fosforilazione di $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ da parte del $\text{TNF}\alpha$ nelle cellule Wild osservata dopo 10 minuti dallo stimolo risultava essere un fenomeno transitorio in quanto non più evidente dopo 20, 30 e 60 minuti. Nelle cellule R92Q la riduzione del grado di fosforilazione osservata dopo 20 e 30 minuti dallo stimolo, era seguita da un nuovo significativo incremento a 60 minuti. Nelle cellule S59P l'aumento di p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ osservato subito dopo lo stimolo (10 minuti) persisteva invariato per tutto il periodo di osservazione, mentre nelle cellule T50M si osservava un incremento progressivo nel tempo della fosforilazione di $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. Abbiamo quindi analizzato nelle cellule WT se vi fosse una risposta dose correlata alla stimolazione con $\text{TNF}\alpha$ sottoponendo le cellule a stimolo con diversi dosaggi di $\text{TNF}\alpha$: 0.6, 6 e 60 ng/mL. La figura 15 riporta i risultati western blot di $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ e i relativi valori densitometrici espressi in percentuale rispetto al controllo non stimolato. Nelle cellule HEK-WT dopo stimolazione con basse dosi di $\text{TNF}\alpha$ (0.6 ng/mL) si osservava una riduzione del grado di fosforilazione di $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, mentre dosi intermedie (6 ng/mL) o elevate (60 ng/mL) inducevano un aumento simile di p- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. In analogia, il rilascio di IL8 nel surnatante delle cellule WT stimolate con bassi dosaggi di $\text{TNF}\alpha$ risultava non significativamente diverso dalle cellule in condizioni basali, mentre il rilascio di IL8 veniva indotto sia da dosi elevate (60 ng/mL) che da dosi intermedie (6 ng/mL) di $\text{TNF}\alpha$ (Analisi della varianza: $F=123.55$, $p<0.0001$) (Figura 15 pannello 3).

La risposta a diverse dosi di $\text{TNF}\alpha$ è stata quindi valutata anche nelle cellule recanti le rispettive mutazioni del recettore mediante la determinazione di IL8 (figura 16). L'analisi della varianza per misurazioni ripetute (controllo non stimolato, $\text{TNF}\alpha$ 0.6, 6 e 60 ng/mL) documentava in tutte le linee studiate una risposta dose-correlata (test degli effetti entro soggetti: $F=74.77$, $p<0.0001$) e un aumento significativo del rilascio di IL8 nelle cellule R92Q e S59P, ma non nelle T50M, rispetto alle WT, essendo comunque il grado di rilascio di IL8 complessivamente più elevato nelle cellule R92Q rispetto alle S59P (test degli effetti fra i soggetti: $F=890.86$, $p<0.0001$). Sulla base di questi risultati, avendo evidenziato una risposta significativa sia nelle cellule di controllo che nelle cellule trasfettate anche allo stimolo con dosaggi intermedi di $\text{TNF}\alpha$, che maggiormente

riflettono le concentrazioni fisiologiche, gli esperimenti successivi sono stati effettuati impiegando il TNF α alla dose di 6 ng/mL.

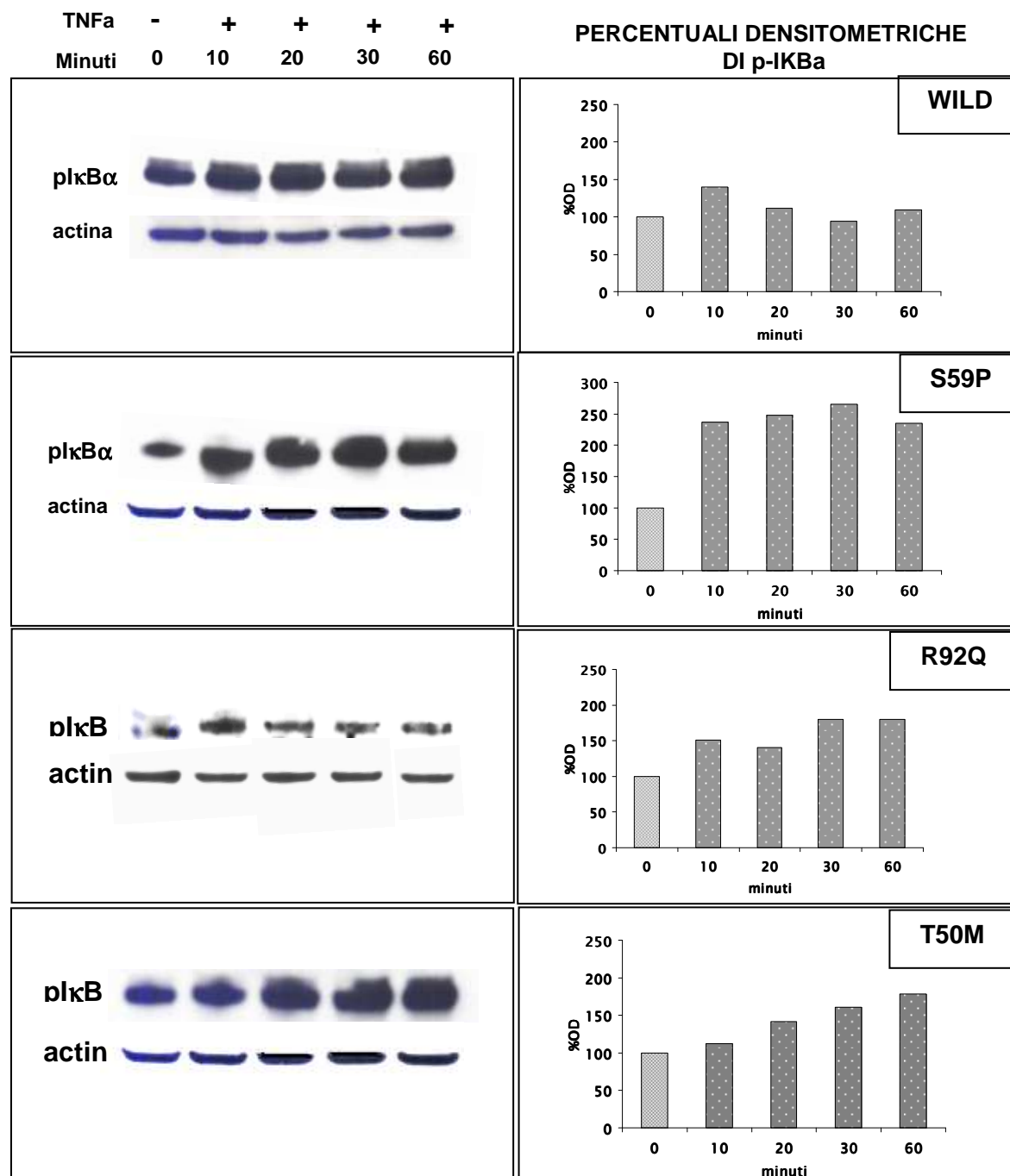


Fig 14

Analisi di immunoblot cellule HEK-WILD, HEK-S59P, HEK-R92Q e HEK-T50M in assenza o con stimolazione con TNF α 60ng/mL a diversi tempi. La figura illustra i risultati ottenuti con l' anticorpo p-IκB α (41KDa).

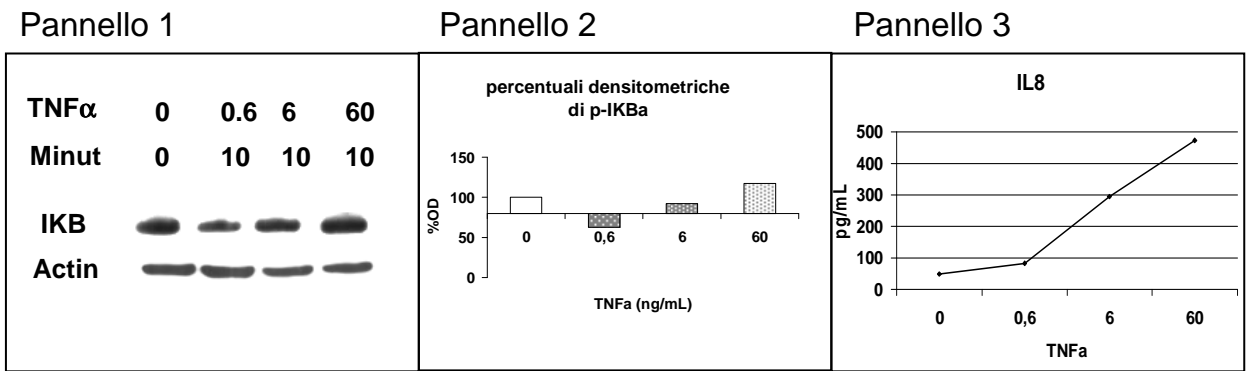


Fig 15

Analisi di immunoblot, percentuali densitometrica e livelli dei IL8 nelle cellule HEK-WILD in assenza o con stimolazione con TNFa a 0,6, 6 e 60ng/mL . La figura illustra nel pannello 1i risultati ottenuti con l' anticorpo p-IkB α (41KDa), nel pannello 2 le percentuali densitometriche della fosforilazione di IKB α e nel pannello 3 i livelli di IL8 rilasciati dalle cellule WILD

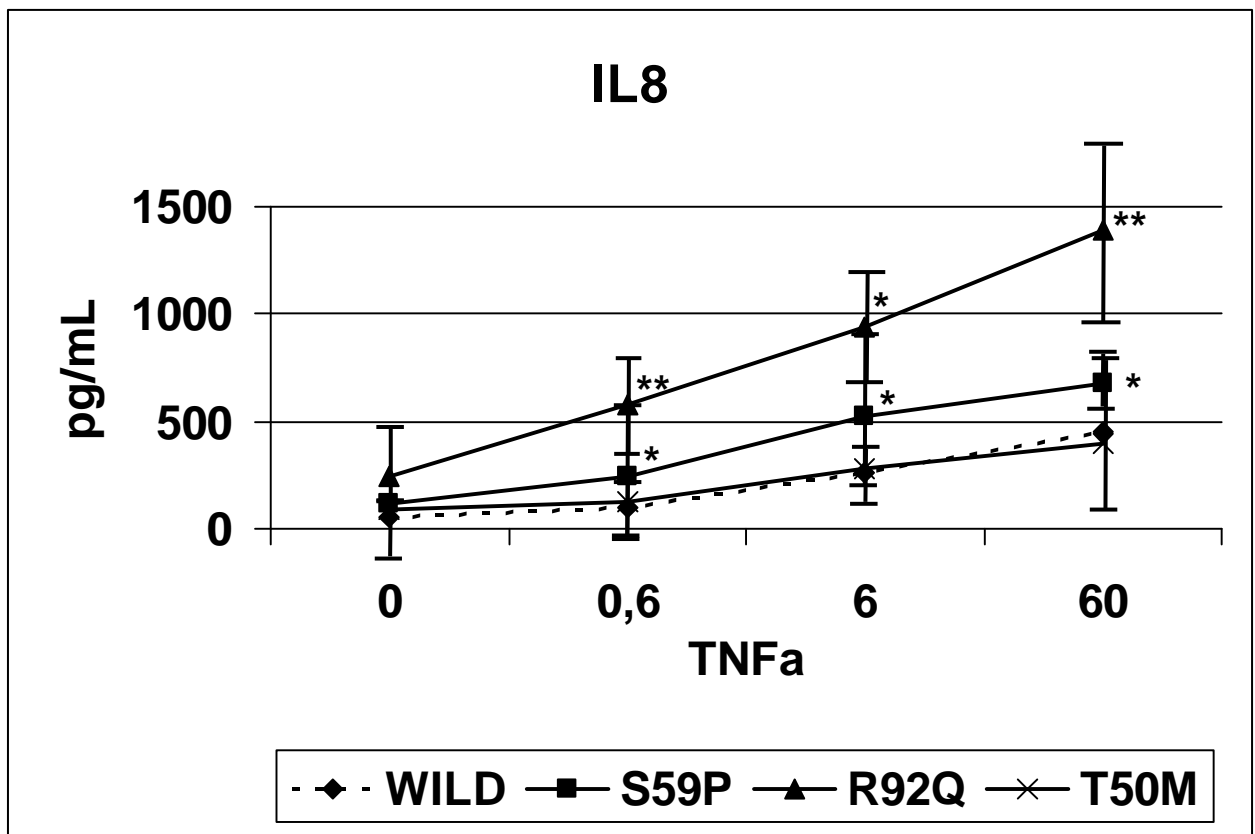


Fig 16

Livelli di IL8 nelle cellule HEK-WILD, HEK-S59P, HEK-R92Q e HEK-T50M in assenza o con stimolazione con TNFa a diverse dosi. La produzione di IL8 risulta essere significativa per le cellule S59P (*) e R92Q (**) rispetto alle cellule WILD

5.2.2 ANALISI DELLA VIA DEL SEGNALE NF κ B

Le cellule con il vettore recante il recettore del TNF WT e con il vettore recante il recettore con le rispettive mutazioni S59P, R92Q e T50M sono state stimulate con TNF α (6ng/mL) ed i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dopo stimolo con IL1 β (1ng/mL). La risposta a questa citochina è stata studiata in quanto il paziente portatore della mutazione S59P aveva presentato una risposta clinica al trattamento con anti-IL1 e non con anti-TNFR. Per la via NF κ B sono stati studiati in particolare i siti di fosforilazione di p-I κ B α (ser32) e p-NF κ B (ser536) per valutare l'attivazione o inibizione della via considerata.

La fosforilazione del complesso IKK determina la sua attivazione e fosforilazione di I κ B α . Un aumento della fosforilazione di quest'ultimo provoca un aumento della sua ubiquitinizzazione e degradazione proteosomica favorendo così il rilascio del complesso NF κ B. L'attivazione di NF κ B, mediante fosforilazione, determina la traslocazione nucleare delle due subunità p65/p50 e attivazione dei geni pro-infiammatori.

La figura 17 mostra i risultati al western blot e i relativi valori densitometrici espressi in percentuale per p-I κ B α nelle cellule HEK recante il vettore WT e nelle cellule HEK recante i vettori con le tre mutazioni considerate (S59P, R92Q, T50M) stimulate con TNF α (6ng/mL) o con IL1 β (1ng/mL) per 10 minuti.

Sia il TNF α che IL1 β inducono una riduzione della fosforilazione di I κ B α nelle cellule WILD mentre si osserva, nelle cellule recanti la mutazione S59P e T50M, un significativo aumento della fosforilazione di questa proteina dopo stimolo con TNF α e in modo particolare dopo stimolo con IL1 β . Nelle cellule recanti la mutazione R92Q entrambi gli stimoli aumentano la fosforilazione di I κ B α .

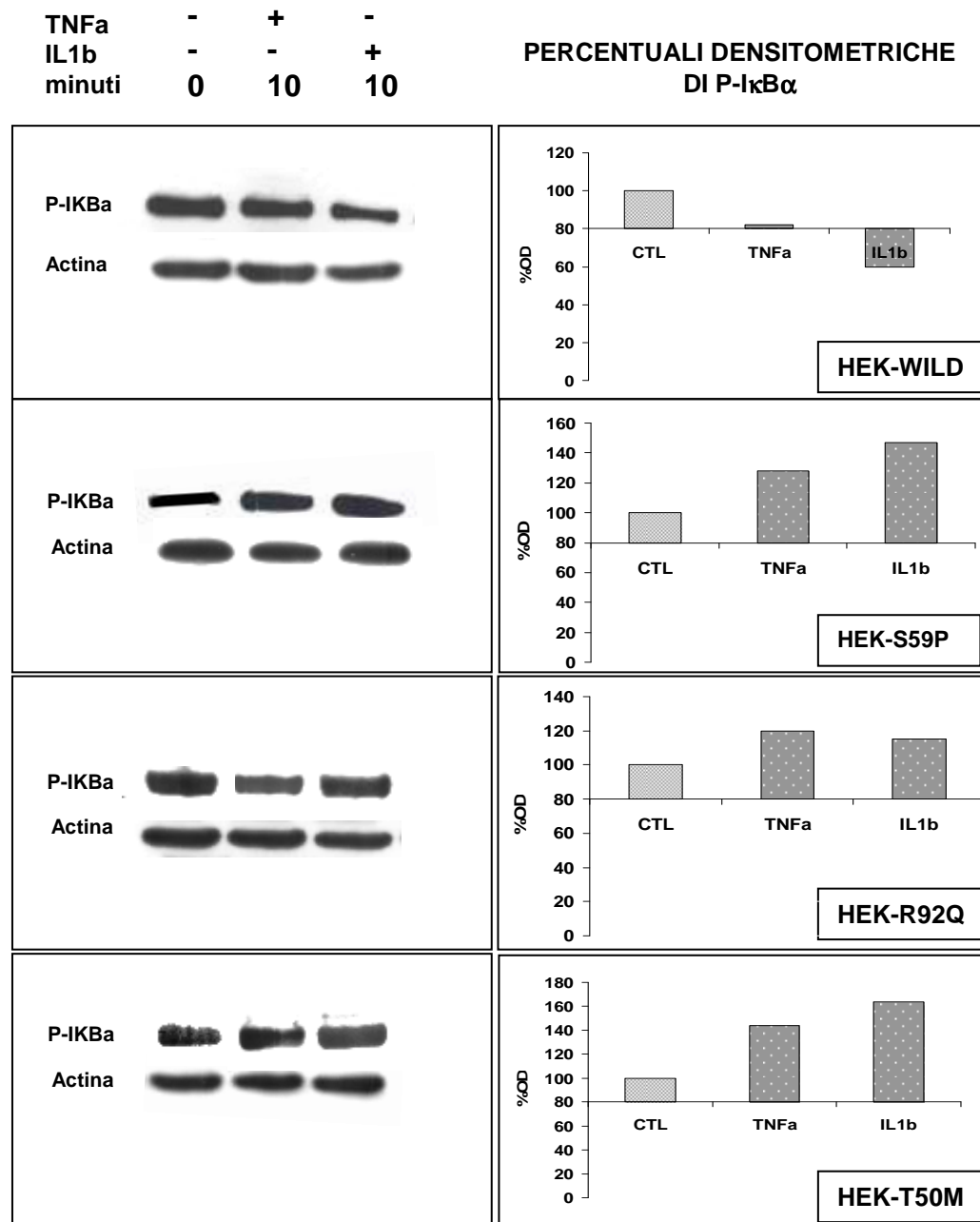


Fig 17

Analisi di immunoblot delle cellule HEK-WILD, HEK-S59P, HEK-R92Q e HEK-T50M in assenza o con stimolazione con TNF α 6ng/mL e IL1b 1ng/mL per 10 minuti. La figura illustra i risultati ottenuti con l' anticorpo p-I κ B α (41KDa) e le corrispondenti percentuali densitometriche

Questo risultato veniva confermato dall'attivazione e traslocazione nel nucleo della subunità p65 di NF κ B. La figura 18 mostra i risultati al western blot e i relativi valori densitometrici espressi in percentuale per p-NF κ B nei nuclei isolati dalle cellule HEK recante il vettore WT e nelle cellule HEK recante i vettori con le tre mutazioni considerate (S59P, R92Q, T50M) stimulate con TNF α (6ng/mL) o con IL1 β (1ng/mL) per 10 minuti.

Nelle cellule WILD sia TNF α che IL1 β non inducevano l'attivazione della subunità p65 di NF κ B. Nelle cellule recanti la mutazione S59P e R92Q, IL1 β ma soprattutto TNF α determinava un significativo aumento della fosforilazione di NF κ B. Nelle cellule recanti la mutazione T50M si osserva una significativa attivazione della subunità p65 di NF κ B anche in condizioni basali. Lo stimolo con IL1 β e soprattutto con TNF α inducevano un rilevante aumento della fosforilazione di NF κ B.

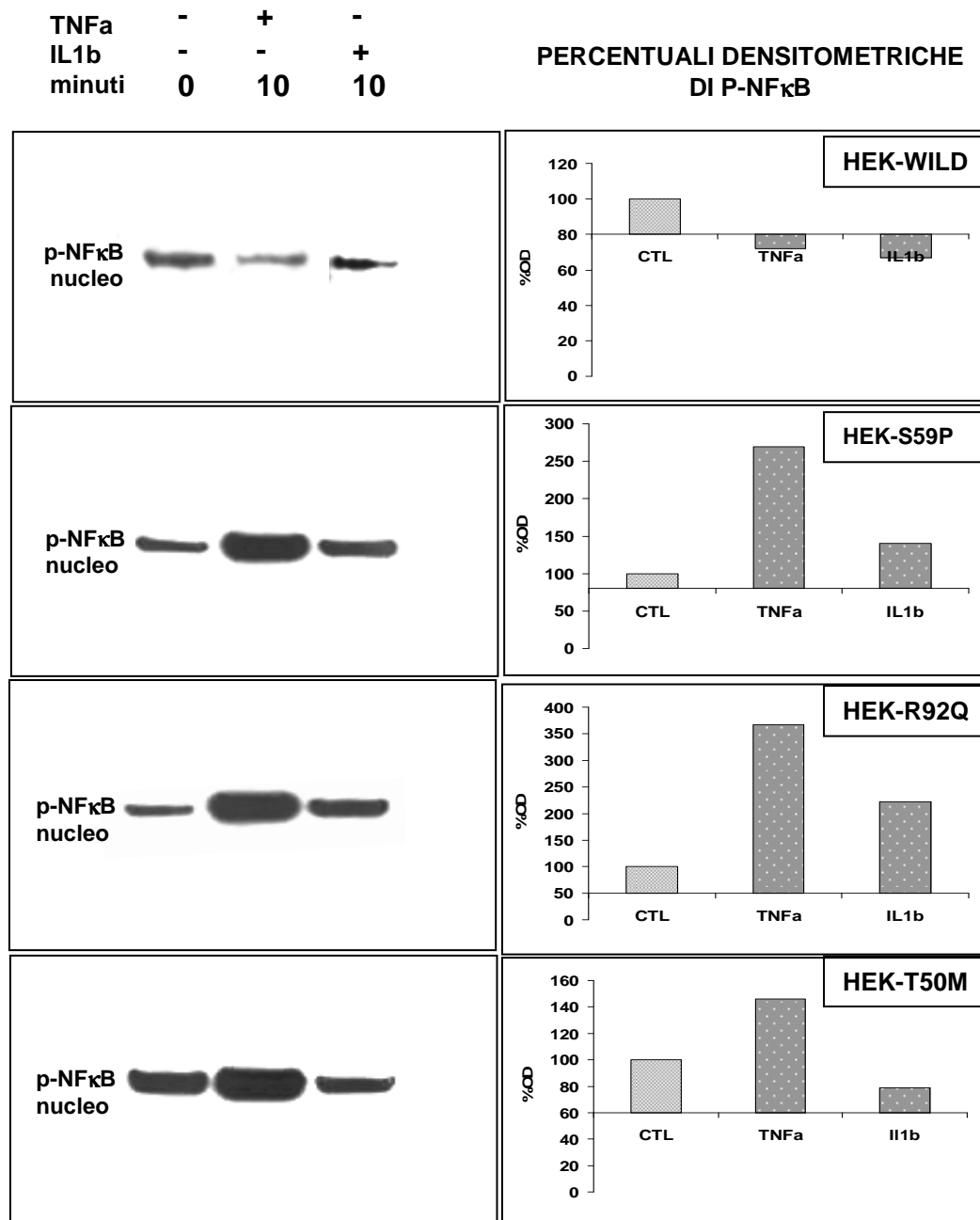


Figura 18

Analisi di immunoblot dei lisati nucleari delle cellule HEK-WILD, HEK-S59P, HEK-R92Q e HEK-T50M in assenza o con stimolazione con TNF α 6ng/mL e IL1 β 1ng/mL per 10 minuti. La figura illustra i risultati ottenuti con l' anticorpo p-NF κ B (65KDa) e le corrispondenti percentuali densitometriche

5.2.3 ANALISI DELLA PRODUZIONE DELLE CITOCHINE PROINFIAMMATORIE

L'attivazione di NF κ B induce la trascrizione delle citochine pro-infiammatorie e per osservare questo fenomeno sono stati dosati i livelli di IL8 rilasciata dalle cellule WT e dalle cellule mutate dopo stimolo con TNF α e IL1 β per 4 ore. IL8 veniva scelta in quanto unica citochina prodotta da questa linea cellulare.

In condizioni basali (Figura 19) le cellule con i vettori recanti le tre rispettive mutazioni S59P, R92Q e T50M rilasciavano una quantità significativa di questa citochina rispetto alle cellule WT (test t di Student a due campioni: $t=-29$, $p<0.0001$; $t=-89.2$ $p<0.0001$, $t=-8.6$ $p<0.001$) Lo stimolo con TNF α induceva nelle cellule con il vettore WT un rilascio di IL8 e una simile quantità veniva osservata nelle cellule con il vettore recante la mutazione T50M ($t=-0.8$ p :ns). Nelle cellule con la mutazione S59P si osservava una quantità di IL8 significativamente più elevata rispetto alle cellule WT ($t=-5.1$, $p<0.005$) e in maniera più accentuata nelle cellule con la mutazione R92Q rispetto alle altre cellule ($t=-52.3$ $p<0.0001$)

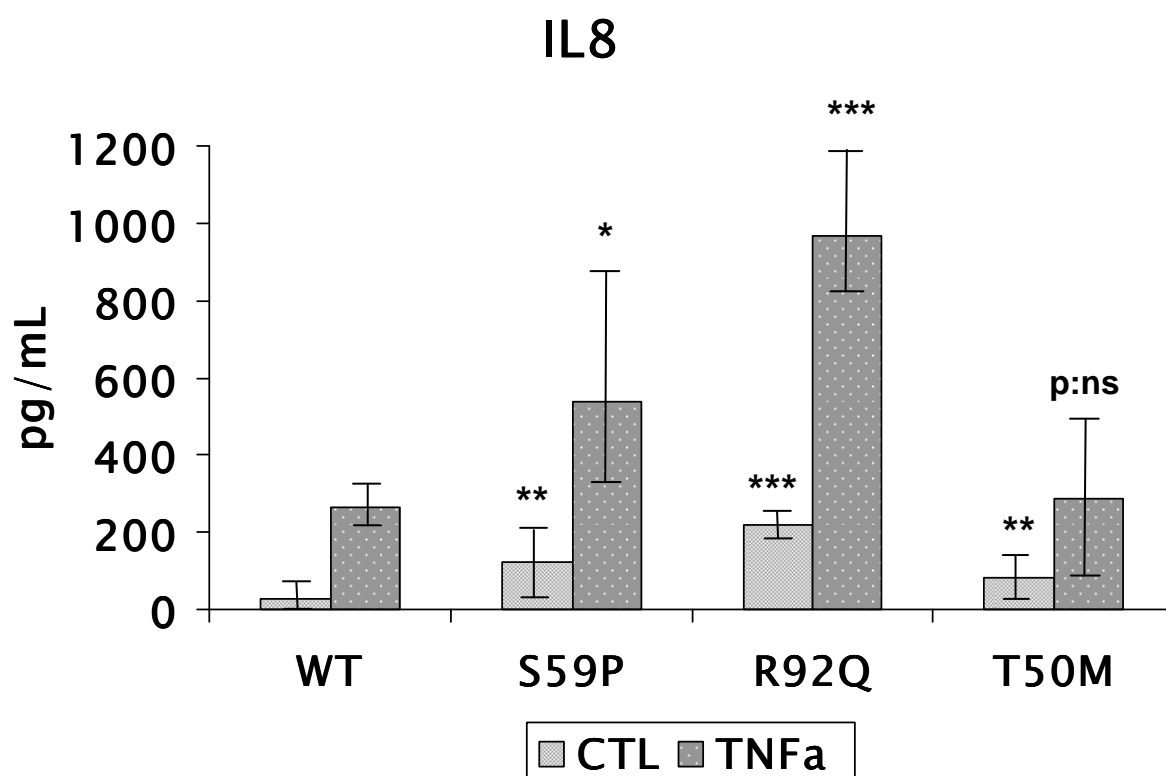


Fig.19

Livelli di IL8 nelle cellule HEK-WILD, HEK-S59P, HEK-R92Q e HEK-T50M in assenza o con stimolazione con TNF α 6ng/mL per 4 ore. *= $p<0.005$; **= $p<0.001$; ***= $p<0.0001$.

Per poter confrontare i risultati ottenuti dagli studi “in vitro” sono stati reclutati due pazienti affetti da TRAPS. Il paziente portatore della mutazione S59P oggetto di studio, attualmente in terapia con anti-IL1 β e un paziente, portatore della mutazione R92Q, attualmente in terapia con anti-TNFR. Inoltre sono stati reclutati 5 soggetti sani privi di mutazione nel gene TNFR1 (W/W). Dal sangue periferico ottenuto dai pazienti e dai soggetti sani sono state isolate le cellule polimorfonucleate (PBMC) e su queste cellule sono stati ripetuti nelle medesime condizioni gli studi della via del segnale di NF κ B.

La figura 20 mostra i risultati al western blot e i relativi valori densitometrici espressi in percentuale per p- I κ B α nei PBMC W/W e nei PBMC del paziente con la mutazione S59P e R92Q stimolati con TNF α (6ng/mL) o con IL1 β (1ng/mL) per 10 minuti.

In condizioni basali la fosforilazione di I κ B α risultava costitutivamente aumentata nei PBMC mutati rispetto ai W/W. Lo stimolo con TNF α e soprattutto con IL1 β accentuavano la fosforilazione di questa proteina nei PBMC dei pazienti rispetto ai PBMC W/W.

La figura 21 mostra i risultati al western blot e i relativi valori densitometrici espressi in percentuale per p-NF κ B nei nuclei isolati dai PBMC W/W e dai PBMC dei pazienti con la mutazione S59P e R92Q stimolati con TNF α (6ng/mL) o con IL1 β (1ng/mL) per 10 minuti.

In condizioni basali l'attivazione della subunità p65 di NF κ B risultava essere aumentata in maniera significativa nei PBMC del paziente con la mutazione S59P. Lo stimolo con TNF α manteneva l'attivazione della proteina in entrambi i PBMC mutati, mentre lo stimolo con IL1 β sosteneva l'attivazione solo nei PBMC del paziente con la mutazione S59P rispetto ai PBMC W/W.

La risposta al TNF α e IL1 β è stata valutata nei PBMC sia W/W che mutati anche mediante la determinazione delle citochine proinfiammatorie: IL1 β , IL6, IL8 e TNF α dopo 24 ore (figura 22) e a 72 ore di coltura (figura 23).

L'analisi della varianza per misure ripetute evidenziava che, a 24 ore di coltura, lo stimolo con LPS induceva un aumento significativo dei livelli di IL1 β nei PBMC W/W (F=35, p<0.0001), nei PBMC del paziente con la mutazione S59P (F=31, p<0.0001) e nei PBMC del paziente con la mutazione R92Q (F=153, p<0.0001); un significativo aumento di IL6 (PBMC W/W: F=44, p<0.0001; PBMC S59P: F=4046, p<0.0001 e PBMC R92Q: F=661, p<0.0001); un significativo aumento di IL8 (PBMC W/W: F=45,

$p < 0.0001$; PBMC S59P: $F=808$, $p < 0.0001$ e PBMC R92Q $F=5755$, $p < 0.0001$) e un significativo aumento dei livelli di $TNF\alpha$ (PBMC W/W $F=198$, $p < 0.0001$; PBMC S59P $F=448$, $p < 0.0001$ e PBMC R92Q $F=53$, $p < 0.0001$) rispetto alla condizione basale e ai due stimoli.

A 72 ore di coltura nei PBMC W/W i livelli di $IL1\beta$ si mantenevano a livello basale anche dopo stimolo con LPS ($F=1$, $p=0.405$) mentre si osservava un significativo aumento del rilascio di questa citochina nei PBMC del paziente con la mutazione S59P ($F=7.55$, $p=0.012$) e nei PBMC con la mutazione R92Q ($F=20.8$, $p < 0.0001$) rispetto alla condizione basale e ai due stimoli.

Al contrario lo stimolo con LPS manteneva un significativo aumento del rilascio di IL6 (PBMC W/W: $F=179$, $p < 0.0001$; PBMC S59P: $F=1055$, $p < 0.0001$ e PBMC R92Q: $F=489$, $p < 0.0001$), di IL8 (PBMC W/W: $F=224$, $p < 0.0001$; PBMC S59P: $F=167$, $p < 0.0001$ e PBMC R92Q: $F=1042$, $p < 0.0001$) e di $TNF\alpha$ (PBMC W/W: $F=323$, $p < 0.0001$; PBMC S59P: $F=507$, $p < 0.0001$ e PBMC R92Q: $F=466$, $p < 0.0001$) rispetto alla condizione basale e ai due stimoli.

Lo stimolo con $TNF\alpha$ a 24 ore di coltura induceva un significativo rilascio di IL8 nei PBMC W/W rispetto ai PBMC dei pazienti TRAPS ($F=29$, $p < 0.0001$) Viceversa a 72 ore di coltura lo stimolo con $TNF\alpha$ non modificava i livelli di questa citochina nei PBMC W/W rispetto alla condizione basale, mentre nei PBMC del paziente S59P e del paziente R92Q i livelli di IL8 si mantenevano significativamente più elevati rispetto ai PBMC W/W ($F=24$, $p < 0.0001$)

Lo stimolo con $IL1\beta$ a 24 ore di coltura induceva un significativo aumento dei livelli di IL8 nei PBMC W/W rispetto ai PBMC mutati ($F=15$, $p < 0.0001$). A 72 ore di coltura il medesimo stimolo manteneva significativamente più elevati i livelli sia di IL6 che di IL8 nei PBMC mutati rispetto ai PBMC W/W ($F=11$, $p=0.004$; $F=322$, $p < 0.0001$).

Nella figura 24 vengono riportate le percentuali di IL6 e IL8 rispetto al corrispondente basale non stimolato dopo stimolo con $IL1\beta$ a 24 e 72 ore di coltura. Si osserva come nei PBMC del paziente con la mutazione S59P e in misura più contenuta nei PBMC del paziente R92Q, lo stimolo con $IL1\beta$ manteneva significativamente più alti i livelli di IL6 rispetto ai PBMC W/W. Lo stesso stimolo solo nei PBMC del paziente con la mutazione S59P manteneva significativamente più alti i livelli di IL8 rispetto ai PBMC W/W e rispetto ai PBMC del paziente con la mutazione R92Q.

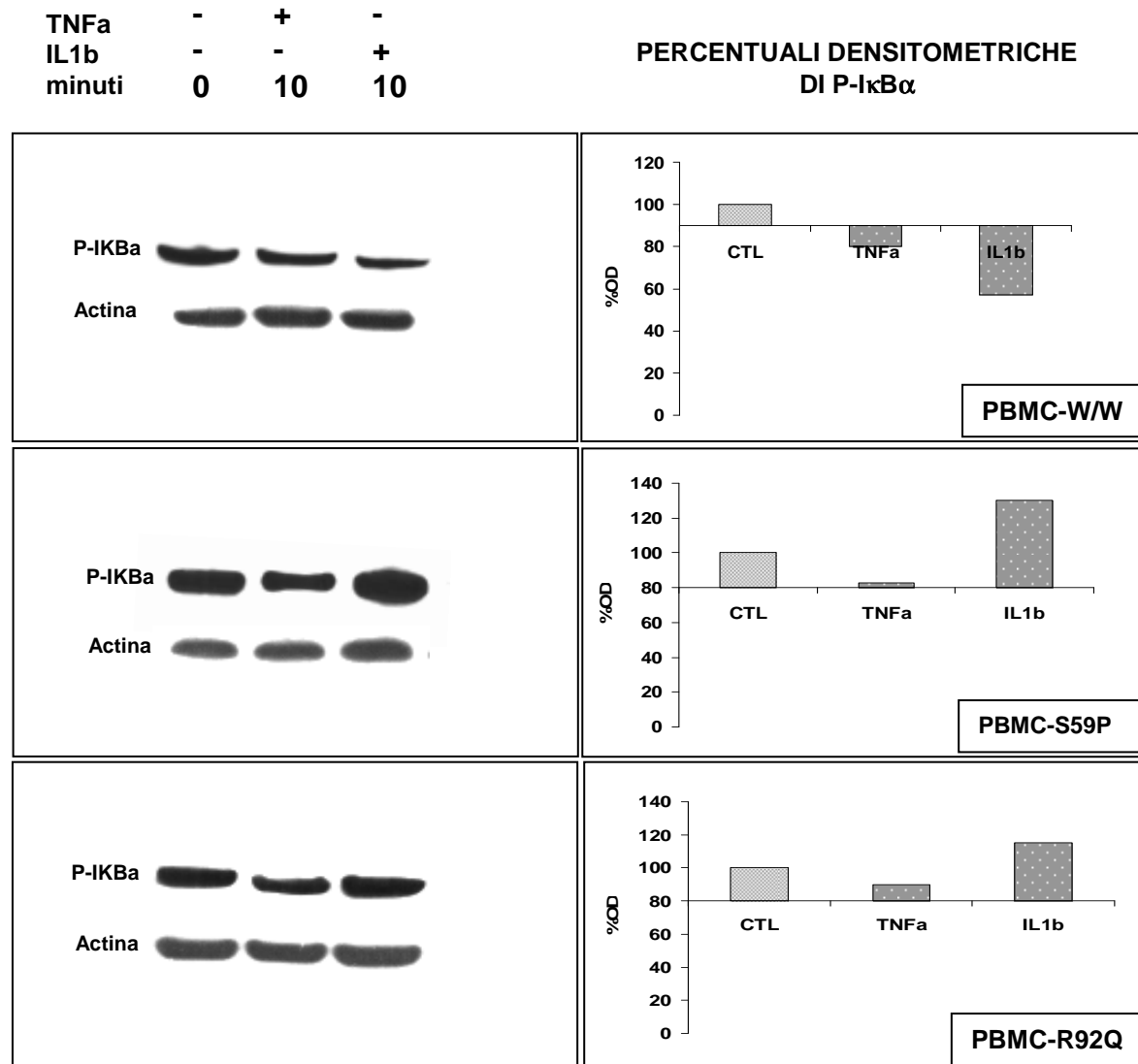


Fig 20

Analisi di immunoblot dei PBMC W/W, PBMC-S59P e PBMC-R92Q in assenza o con stimolazione con TNF α 6ng/mL e IL1b 1ng/mL per 10 minuti. La figura illustra i risultati ottenuti con l' anticorpo p-I κ B α (41KDa) e le corrispondenti percentuali densitometriche

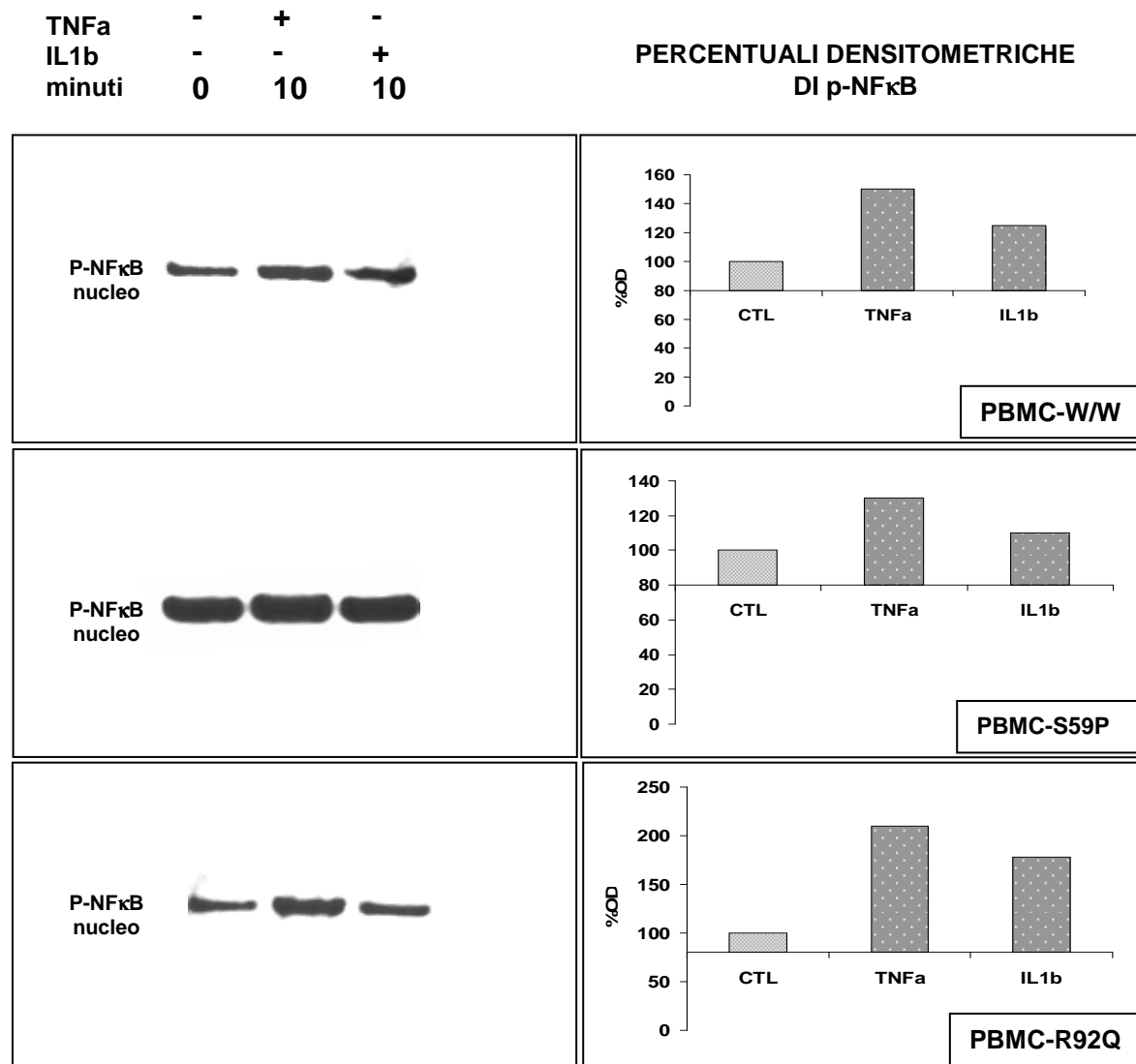


Fig 21

Analisi di immunoblot dei lisati nucleari dei PBMC W/W, PBMC-S59P e PBMC-R92Q in assenza o con stimolazione con TNF α 6ng/mL e IL1 β 1ng/mL per 10 minuti. La figura illustra i risultati ottenuti con l' anticorpo p-NF κ B (65KDa) e le corrispondenti percentuali densitometriche

24 ore

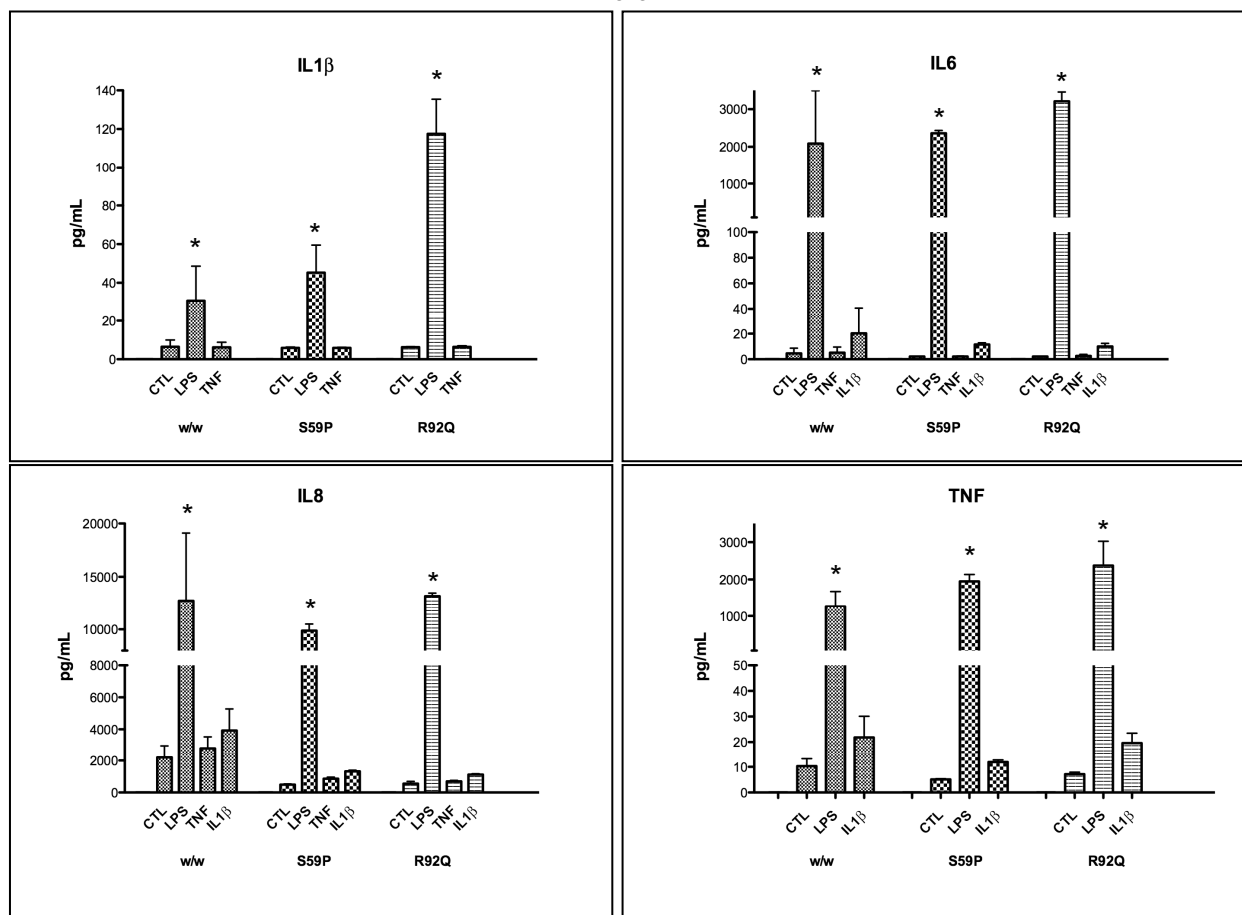


Fig.22

Livelli di IL1b, IL6, IL8 e TNF α nei PBMC-W/W, PBMC-S59P e PBMC-R92Q in assenza o con stimolazione con LPS 1 μ g/mL ,TNF α 6ng/mL e IL1 β 1ng/mL per 4 ore dopo 24 ore di coltura.

*= p<0.0001 verso il controllo e gli stimoli con TNF α e IL1 β

72 ore

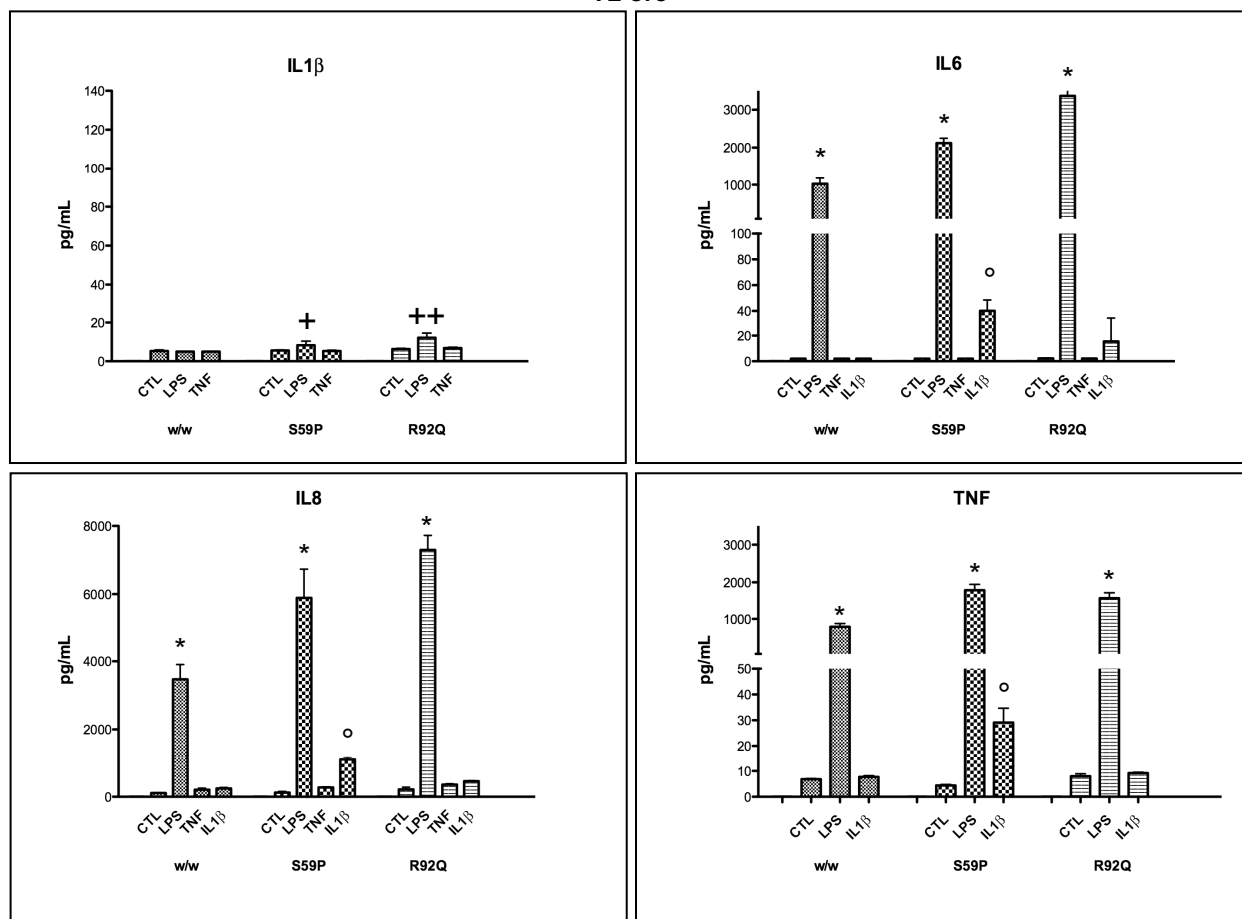


Fig 23

Livelli di IL1 β , IL6, IL8 e TNF α nei PBMC-W/W, PBMC-S59P e PBMC-R92Q in assenza o con stimolazione con LPS 1 μ g/mL, TNF α 6ng/mL e IL1 β 1ng/mL per 4 ore dopo 72 ore di coltura.

*= p < 0.0001 verso il controllo e verso gli stimoli TNF α e IL1 β

+= p < 0.05 verso il controllo e verso gli stimoli TNF α e IL1 β

++= p < 0.001 verso il controllo e verso gli stimoli TNF α e IL1 β

\circ = p < 0.001 verso il controllo

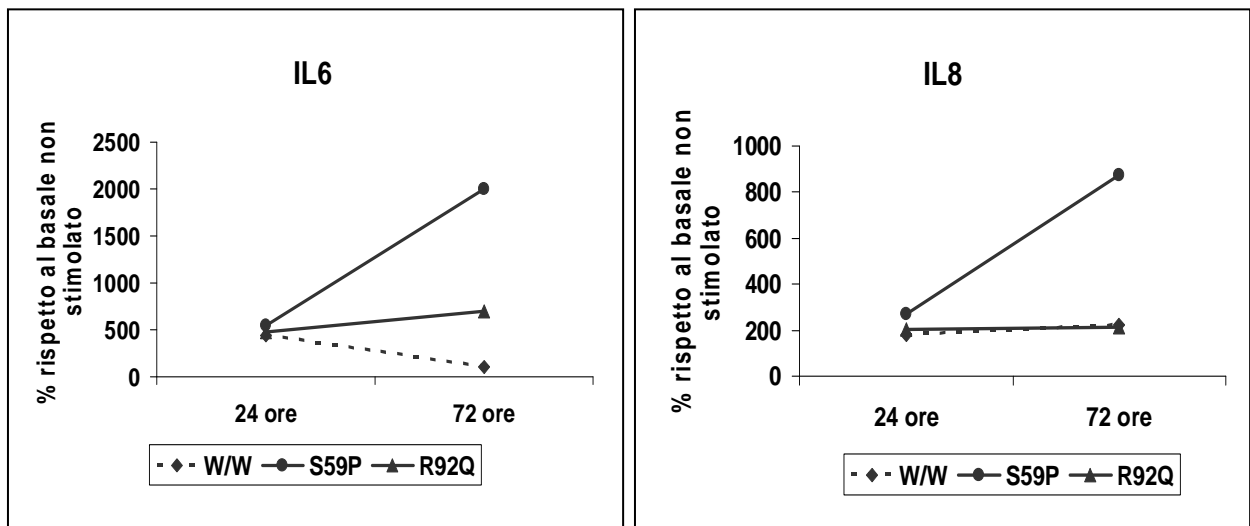


Fig.24

percentuali di IL6 e IL8 rispetto al corrispondente basale non stimolato dopo stimolo con IL1 β a 24 e 72 ore di cultura nei PBMC dei soggetti W/W, del paziente S59P e del paziente R92Q.

6. DISCUSSIONE

La sindrome periodica associata al recettore del TNF (TRAPS) è una malattia genetica a carattere autosomico dominante, dovuta a mutazioni nel gene del recettore del TNF. La maggior parte delle mutazioni coinvolgono la regione extracellulare (CRD) del recettore, implicata nel legame con il TNF α .

I meccanismi cellulari che descrivono il modo di agire del recettore mutato possono variare, a seconda della mutazione presente e possono determinare un quadro clinico fenotipico differente.

Nel nostro laboratorio è stata recentemente individuata una nuova mutazione presente nell'esone 3 del recettore del TNF in un paziente affetto da TRAPS che comporta la sostituzione di una Serina in una Prolina in posizione 59 della proteina matura implicata nel legame con il TNF α . La struttura molecolare della prolina è tale da creare un ingombro sterico all'interno della struttura secondaria.

Per poter comprendere quali siano le caratteristiche funzionali che questa mutazione possa portare nella fisiopatologia della TRAPS, abbiamo confrontato gli studi effettuati con quelli di due mutazioni note in letteratura: la mutazione a bassa penetranza R92Q e la mutazione ad alta penetranza T50M.

La scelta di queste due mutazioni è stata dettata dalle seguenti motivazioni.

- 1) le due mutazioni non coinvolgono i residui cisteinici del dominio extracellulare.
- 2) La mutazione R92Q determina un quadro fenotipico eterogeneo dove si osserva come alcuni soggetti portatori della mutazione possano essere sintomatici e altri portatori della stessa variante che invece non presentano alcuna sintomatologia.
- 3) La mutazione T50M determina un quadro clinico severo.

Data la complessità dello studio fisiopatologico che comporta l'impiego di un elevato numero di cellule, per motivi etici abbiamo effettuato lo studio impiegando un modello sperimentale in vitro e utilizzato le cellule dei pazienti solo per confermare i risultati più salienti. Pertanto la prima parte del lavoro è stata dedicata alla creazione di un vettore di espressione che contenesse il cDNA del recettore WT e i vettori contenenti il cDNA del recettore ciascuno con le rispettive mutazioni considerate: c.262T>C (S59P), c.362G>A (R92Q) c.236C>T(T50M).

Per consentire l'espressione dei quattro vettori ottenuti, è stata individuata la linea cellulare Human Embionic Kidney 293 (HEK-293) che risulta essere facilmente trasfettabile e presenta una moderata espressione del recettore I del TNF in condizioni basali.

Dal momento che le cellule mantenevano stabilmente i vettori inseriti, ci siamo focalizzati inizialmente sulla localizzazione cellulare del recettore mediante analisi di immunofluorescenza.

In condizioni fisiologiche l'espressione del recettore risultava contenuta con una distribuzione omogenea nella cellula. La presenza di uno stimolo infiammatorio come il $\text{TNF}\alpha$ determinava un aumento considerevole dell'espressione del recettore e la sua traslocazione, unicamente sulla superficie cellulare senza accumulo di aggregati citoplasmatici. La presenza di una mutazione nella regione extracellulare della proteina influenzava la sua distribuzione nella cellula. In assenza di stimoli infiammatori, le cellule con il vettore recante la mutazione S59P presentavano una debole espressione del recettore con una distribuzione omogenea esclusivamente citoplasmatica. Le cellule con il vettore recante la mutazione R92Q presentavano un comportamento simile a quello osservato nelle cellule WT. Nelle cellule con la mutazione T50M invece si osservava un'elevata espressione del recettore con una distribuzione interamente citosolica sotto forma di aggregati.

In presenza di uno stimolo infiammatorio l'espressione del recettore nelle cellule con la mutazione S59P risultava essere alquanto moderata con formazione di aggregati citosolici. Potremmo supporre che questa mutazione possa determinare una proteina con un disordine conformazionale tale da restare intrappolata all'interno della cellula.

Nelle cellule con la mutazione R92Q si osservava un comportamento intermedio del recettore con la presenza sia di aggregati citoplasmatici sia una distribuzione sulla membrana cellulare. Probabilmente questa mutazione non influenza in maniera rilevante la conformazione della proteina in modo da influenzare il "trafficking" cellulare.

Nelle cellule con la mutazione T50M, l'espressione del recettore si manteneva elevata con un sovraccarico nel citosol in forma di aggregati. Un'ipotesi è che in questa mutazione l'elevata espressione possa determinare un "misfolding" e che la formazione di aggregati possa essere la conseguenza di un sovraccarico nel citosol della proteina con un "folding" errato (Rebelo SL et al. 2006)

Il target principale del recettore del TNF è l'attivazione della via $\text{NF}\kappa\text{B}$. L'attivazione del recettore determina una serie di eventi a cascata con formazione del complesso IKK che fosforila $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, l'inibitore di $\text{NF}\kappa\text{B}$, provocandone la degradazione via ubiquitinizzazione. Il complesso $\text{NF}\kappa\text{B}$ è così libero di traslocare nel nucleo e attivare i geni pro-infiammatori.

In condizioni di normale attività di TNFR1, l'attivazione della via NF κ B è un fenomeno che si innesca velocemente per poi diminuire nel tempo probabilmente dovuto al subentrare del processo apoptotico che invece si innesca più tardivamente.

La presenza della mutazione nel dominio extracellulare della proteina porta ad un recettore che risulta essere costitutivamente attivo anche in assenza di legame con il ligando. Sia la mutazione S59P che R92Q e T50M sembrano conferire una maggiore e persistente sensibilità del recettore agli stimoli infiammatori, infatti la fosforilazione di I κ B α risultava essere di gran lunga aumentata e persistente nel tempo dopo un' unica stimolazione con TNF α nelle cellule mutate rispetto alle cellule con il vettore WT. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto all'azione combinata del recettore mutato che, anche se trattenuto nel citosol, risultava comunque attivo indipendentemente dal legame con il TNF α , e del recettore WT attivato dalla stimolazione con TNF α . E' da ricordare infatti, che in queste cellule, si presenta uno stato di eterozigosi quindi, oltre al recettore mutato è presente il recettore in forma WT.

L' attivazione e traslocazione di NF κ B nel nucleo si correla con quanto osservato con I κ B α . La subunità p65 di NF κ B ha un importante ruolo di protezione dall' apoptosi durante il signalling innescato da TNF α e nella risposta dell'immunità innata a stimoli infiammatori. Dai risultati di western blotting abbiamo osservato che nelle cellule mutate il TNF α aumentava in maniera preponderante la fosforilazione della subunità p65. Inoltre nelle cellule con la mutazione T50M questa subunità era costitutivamente attiva, in accordo con i dati della letteratura. Una possibile conseguenza dell'abbondanza di P65 nel nucleo rende le cellule mutate insensibili all'apoptosi mantenendole in un continuo stato infiammatorio.

L'attivazione di NF κ B guida la secrezione delle citochine proinfiammatorie. Abbiamo perciò investigato questo fenomeno nelle cellule considerate misurando, mediante sistema immunoenzimatico, i livelli di IL8, unica citochina ad esser prodotta da questa linea cellulare. Nelle mutazioni considerate, l'aumento dell'attività di NF κ B porta ad innescare una risposta infiammatoria che risulta essere particolarmente elevata in presenza della mutazione R92Q e più contenuta in presenza della mutazione S59P. Nelle cellule con la mutazione T50M, nonostante l'attivazione di NF κ B dopo stimolo con TNF α , non si osservava un corrispondente aumento dei livelli di secrezione di IL8, che erano paragonabili ai livelli delle cellule con il recettore WT. Questa discrepanza potrebbe dipendere dal fatto che il grado di fosforilazione e la traslocazione nucleare della sub unità p65 nelle cellule con questa mutazione, seppur aumentata rispetto al

controllo era meno marcata rispetto a quanto osservato nelle cellule con le altre due mutazioni studiate. Questo risultato, diverso rispetto a quanto riportato in letteratura (Nedjai B. et al, 2011) per la mutazione coinvolgente la stessa posizione aminoacidica (T50K), potrebbe essere dovuto alla diversa struttura degli aminoacidi coinvolti: metionina (M) e non Lisina K).

La terapia con anti-TNFR è stata quasi sempre considerata la terapia di prima scelta per il trattamento della TRAPS però è stato osservato che spesso l'uso prolungato del farmaco non è in grado di eliminare completamente l'infiammazione e la terapia con anti TNF α è risultata essere spesso inefficace. Recentemente è stato osservato che la terapia anti-IL1R risulta essere molto promettente in quei pazienti che non rispondono alla terapia con anti-TNFR. Nel paziente con la mutazione S59P infatti la scelta di questa terapia è stata di grande beneficio. Questo indica che il "signalling pathway" di IL1 ha un ruolo nella patogenesi della TRAPS.

Sulla base di queste considerazioni abbiamo eseguito i medesimi esperimenti per l'analisi della via del segnale di NF κ B, stimolando le cellule con IL1 β . Dai risultati ottenuti è emerso che questa citochina in condizioni fisiologiche non sembra influenzare l'attività di NF κ B nella linea cellulare considerata. Al contrario nelle cellule con TNFR mutato si osservava una risposta allo stimolo con IL1 β anche se più contenuta rispetto al TNF α . La cascata di attivazione della via di IL1R culmina nell'attivazione del complesso IKK che segue poi la via classica di NF κ B. Probabilmente nelle cellule mutate, nelle quali si presenta in maniera costitutiva uno stato infiammatorio attivato, IL1 β ne amplia l'effetto.

Per confermare che i risultati ottenuti in vitro hanno anche rilevanza clinica, abbiamo isolato i PBMC dal sangue periferico del paziente con la mutazione S59P, da un paziente con la mutazione R92Q e da cinque soggetti sani privi di mutazione nel gene del TNFR che sono stati considerati controllo di riferimento. Nella nostra casistica fino ad ora non è stato mai osservato nessun paziente con la mutazione T50M.

Dagli esperimenti di western blotting per l'analisi della via del segnale NF κ B i risultati ottenuti utilizzando le cellule dei pazienti confermavano i risultati in vitro. Nei PBMC dei pazienti affetti da TRAPS si osservava un'attivazione costitutiva della via infiammatoria NF κ B che veniva amplificata dopo esposizione agli stimoli infiammatori. In accordo con i benefici clinici rilevati dopo trattamento con anti-IL1R, nel paziente con la mutazione S59P lo stimolo con IL1 β sosteneva con maggior rilievo sia la fosforilazione di I κ B α sia l'attivazione della subunità p65 di NF κ B.

Poiché i pazienti al momento del prelievo erano in terapia, per valutare la risposta infiammatoria dei PBMC in condizione basale e dopo stimolo con $TNF\alpha$ e $IL1\beta$, le cellule sono state mantenute in coltura per 24 e 72 ore prima della sperimentazione (wash out) in modo da escludere una possibile interferenza dovuta alla terapia. Lo stimolo con LPS è stato utilizzato come controllo positivo, in quanto rappresenta un eccellente stimolo dell'immunità innata.

Dopo 24 ore di coltura, lo stimolo con LPS o $TNF\alpha$ o $IL1\beta$, non evidenziava alcuna differenza sostanziale nel rilascio delle citochine proinfiammatorie, condizionata dalla mutazione. Solo nei PBMC del paziente R92Q si osservava un'ipersensibilità al LPS, nel rilascio di $IL1\beta$.

A 72 ore di coltura nel paziente S59P, lo stimolo con $IL1\beta$, comportava una risposta elevata e persistente nella produzione di $IL6$ e $IL8$. Nel paziente R92Q una risposta analoga si osservava solo nella produzione di $IL6$.

Nella recente mutazione da noi studiata il risultato conseguito può dipendere da un effetto sinergico che fa persistere più a lungo la risposta.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Hull KM, Drewe E, Aksentijevich I, Singh HK, Wong K, McDermott EM, Dean J, Powell RJ, Kastner DL. The TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): emerging concepts of an autoinflammatory disorder. *Medicine (Baltimore)*. 2002 Sep;81(5):349-68.
2. Hoffman HM, Simon A. Recurrent febrile syndromes: what a rheumatologist needs to know. *Nat Rev Rheumatol*. 2009 May;5(5):249-56. doi: 10.1038/nrrheum.2009.40.
3. Yao Q, Furst DE. Autoinflammatory diseases: an update of clinical and genetic aspects. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Jul;47(7):946-51.
4. Farasat S, Aksentijevich I, Toro JR. Autoinflammatory diseases. *Arch Dermatol* 2008; 144: 392-402.
5. Chae JJ, Cho YH, Lee GS, et al. Gain-of-function pyrin mutations induce NLRP3 protein-independent interleukin-1 beta activation and severe autoinflammation in mice. *Immunity* 2011; 34:755-768.
6. Ammouri W, Cuisset L, Rouaghe S, et al. Diagnostic value of serum immunoglobulinemia D level in patients with a clinical suspicion of hyper IgD syndrome. *Rheumatology* 2007;46:1597-1600.
7. Pontillo A, Paoluzzi E, Crovella S, The inhibition of mevalonate pathway induces upregulation of NALP3 expression: new insight in the pathogenesis of mevalonato kinase deficiency. *Eur J Hum Genet* 2010; 18: 844-847.
8. McDermott MF, Aksentijevich I, Galon J, et al. Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell*. 1999 Apr 2;97(1):133-44.
9. Aganna E, Hammond L, Hawkins PN, et al. Heterogeneity among patients with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome phenotypes. *Arthritis Rheum*. 2003 Sep;48(9):2632-44.
10. Pelagatti MA, Meini A, Caorsi R, et al. Long-term clinical profile of children with the low-penetrance R92Q mutation of the TNFRSF1A gene. *Arthritis Rheum*. 2011 Apr;63(4):1141-50.
11. Lasiglie D, Traggiai E, Federici S, et al. Role of IL-1 beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLRP3 mutated patients. *PloS one* 2011; 6: e20014.
12. Jeru I, Duquesnoy P, Ferdnandes-Alnemri T, et al. Mutation in NALP12 cause hereditary periodic fever syndrome. *Proc Natl Acad USA* 2008; 105: 1614-1619.

13. Borghini S, Tassi S, Chiesa S, et al. Clinical presentation and pathogenesis of cold-induced autoinflammatory disease in a family with recurrence of an NLRP12 mutation. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 830-839.
14. Jeru I, Le borgne G, Cchet E, et al. Identification and functional consequences of a recurrent NLRP12 missense mutation in periodic fever syndrome. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 1459-1464.
15. Yu JW, Fernandes-Alnemri T, Datta P, et al. Pyrin activates the ASC pyroptosome in response to engagement by autoinflammatory PSTPIP1 mutants. *Mol Cell* 2007; 28: 214-227.
16. Smith EJ, Allantaz F, Bennet L, et al. Clinical Molecular and genetic characteristics of PAPA syndrome: a review. *Curr Genom* 2010; 11: 519-527.
17. Ferguson PJ, El-Shanti HI. Autoinflammatory bone disorders, *Curr Opin Rheumatology* 2007; 19: 492-498.
18. Kanazawa N, Okafuji I, Kambe N, et al. Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutation with constitutive nuclear factor-kappaB activation: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood* 2005; 105: 1195-1197.
19. Martin TM, Zhang Z, Kurz P, et al. The NOD2 defect in Blau syndrome does not result in excess interleukin-1 activity. *Arthritis Rheum* 2009; 60:611-618.
20. Williamson LM, Hull D, Mehta R, Reeves WG, Robinson BH, Toghiani PJ. Familial Hibernian fever. *Q J Med.* 1982;51(204):469-80.
21. De Sanctis S, Nozzi M, Del Torto M, et al. Autoinflammatory syndromes: diagnosis and management. *Ital J Pediatr.* 2010 Sep 3;36:57.
22. Schmaltz R, Vogt T, Reichrath J. Skin manifestations in tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome (TRAPS). *Dermatoendocrinol.* 2010 Jan;2(1):26-9.
23. Rigante D, Cantarini L, Imazio M, et al. Autoinflammatory diseases and cardiovascular manifestations. *Ann Med.* 2011 Aug;43(5):341-6.
24. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501.
25. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signalling. *Cell Death and Differentiation* 2003;10:45-65.
26. McFarlane SM, Pashmi G, Connell MC, Littlejohn AF, Tucker SJ, Vandenabeele P, MacEwan DJ. Differential activation of nuclear factor-kappaB by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly. *FEBS Lett.* 2002 Mar 27;515(1-3):119-26.

27. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*. 2002 May 31;296(5573):1634-5.
28. Muddidi JR, Tschopp J, Siegel RM. Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* 2004; 21:461-465.
29. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003 Jul 25;114(2):181-90.
- 30.
31. Milhavel F, Cuisset L, Hoffman HM, et al. The infevers autoinflammatory mutation online registry: update with new genes and functions. *Hum Mutat*. 2008 Jun;29(6):803-8.
32. Kriegel MA, Hüffmeier U, Scherb E, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome characterized by a mutation affecting the cleavage site of the receptor: implications for pathogenesis. *Arthritis Rheum*. 2003 Aug;48(8):2386-8.
33. Lehmann P, Salzberger B, Haerle P, et al. Variable intrafamilial expressivity of the rare tumor necrosis factor-receptor associated periodic syndrome-associated mutation I170N that affects the TNFR1A cleavage site. *Mod Rheumatol*. 2010 Jun;20(3):311-5.
34. Aksentijevich I, Galon J, Soares M, Mansfield E, Hull K, et al. The tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome: new mutation in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. *Am J Hum Genet* 2001;69: 301-314.
35. Hull KM, Drewe E, Aksentijevich I, et al. The TNF receptor-associated periodic syndrome (TRAPS): emerging concepts of an autoinflammatory disorder. *Medicine (Baltimore)*. 2002 Sep;81(5):349-68.
36. Ravet N, Rouaghe S, Dodé C, et al. Clinical significance of P46L and R92Q substitutions in the tumour necrosis factor superfamily 1A gene. *Ann Rheum Dis*. 2006 Sep;65(9):1158-62.
37. Cantarini L, Lucherini OM, Cimaz R, et al. Idiopathic recurrent pericarditis refractory to colchicine treatment can reveal tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2009 Oct-Dec;22(4):1051-8.
38. Cantarini L, Lucherini OM, Cimaz R, et al. Recurrent pericarditis caused by a rare mutation in the TNFRSF1A gene and with excellent response to anakinra treatment. *Clin Exp Rheumatol*. 2010 Sep-Oct;28(5):802. Epub 2010 Oct 22.

39. Todd I, Radford PM, Draper-Morgan KA, et al. Mutant forms of tumour necrosis factor receptor I that occur in TNF-receptor-associated periodic syndrome retain signalling functions but show abnormal behaviour. *Immunology*. 2004 Sep;113(1):65-79.
40. Huggins ML, Radford PM, McIntosh RS, et al. Shedding of mutant tumor necrosis factor receptor superfamily 1A associated with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome: differences between cell types. *Arthritis Rheum*. 2004 Aug;50(8):2651-9.
41. Galon J, Aksentijevich I, McDermott MF, et al. TNFRSF1A mutations and autoinflammatory syndromes. *Curr Opin Immunol*. 2000 Aug;12(4):479-86. Review.
42. Todd I, Radford PM, Daffa N, et al. Mutant tumor necrosis factor receptor associated with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome is altered antigenically and is retained within patients' leukocytes. *Arthritis Rheum*. 2007 Aug;56(8):2765-73.
43. Lobito AA, Kimberley FC, Muppidi JR, et al. Abnormal disulfide-linked oligomerization results in ER retention and altered signaling by TNFR1 mutants in TNFR1-associated periodic fever syndrome (TRAPS). *Blood*. 2006 Aug 15;108(4):1320-7.
44. Rebelo SL, Bainbridge SE, Amel-Kashipaz MR, et al. Modeling of tumor necrosis factor receptor superfamily 1A mutants associated with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome indicates misfolding consistent with abnormal function. *Arthritis Rheum*. 2006 Aug;54(8):2674-87.
45. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60.
46. May MJ, Ghosh S. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol*. 1997 Apr;8(2):63-73.
47. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kB activation pathways and their role in innate and adaptative immunity. *TRENDS in immunology* 2004;26:280-288.
48. Schmitz ML, mattioli I, Buss H, Kracht M. NF-kB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chem Bio Chem* 2004; 5: 1348-1358.
49. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2195-224.
50. Moynagh PN. The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci*. 2005 Oct 15;118(Pt 20):4589-92.
51. Viatour P, Merville MP, Bours V, et al. Phosphorylation of NF-kappaB and

52. I κ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci.* 2005 Jan;30(1):43-52.
53. Zhou Z, Connell MC, MacEwan DJ. TNFR1-induced NF- κ B, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cell Signal.* 2007 Jun;19(6):1238-48.
54. Ganef C, Remouchamps C, Boutaffala L, et al. Induction of the alternative NF- κ B pathway by lymphotoxin $\alpha\beta$ (LT $\alpha\beta$) relies on internalization of LT β receptor. *Mol Cell Biol.* 2011 Nov;31(21):4319-34.
55. Alcamo E, Mizgerd JP, Horwitz BH, et al. Targeted mutation of TNF receptor I rescues the RelA-deficient mouse and reveals a critical role for NF- κ B in leukocyte recruitment. *J Immunol.* 2001 Aug 1;167(3):1592-600.
56. Nedjai B, Hitman GA, Yousaf N, et al. Abnormal tumor necrosis factor receptor I cell surface expression and NF- κ B activation in tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome. *Arthritis Rheum.* 2008 Jan;58(1):273-83.
57. Nedjai B, Hitman GA, Church LD, et al. Differential cytokine secretion results from p65 and c-Rel NF- κ B subunit signaling in peripheral blood mononuclear cells of TNF receptor-associated periodic syndrome patients. *Cell Immunol.* 2011;268(2):55-9.

Ringraziamenti

Un grazie di cuore a tutte le persone che lavorano nella Biologia Molecolare dell'Azienda Ospedaliera di Padova. In particolare a: Daniela, Carlo, Filippo, Paola, Andrea, Stefania, Dania, Ada, Michela, Monica, Cinzia e Marco per il loro sostegno e la professionalità che mi hanno accompagnato nella realizzazione di questa tesi

Un grazie di cuore alle persone che lavorano nel laboratorio di Genetica dell'Istituto di Biologia Vallisneri di Padova. In particolare alla prof.ssa Alessandra Rampazzo, Manuela, Marzia e Martina per la loro disponibilità e pazienza nell'insegnarmi le tecniche di mutagenesi e di immunofluorescenza.

Un grazie di cuore ad Alessandra Gava e Paola Galozzi, per aver condiviso questa esperienza di dottorato.

Un grazie di cuore al prof. Leonardo Punzi, per avermi dato la possibilità di frequentare il dottorato appena concluso.

Un grazie di cuore al Prof. Mario Plebani per essere sempre fiducioso e ottimista nel mio operato.

Infine un grazie di cuore alla mia famiglia per essermi sempre vicina nelle scelte fin'ora prese.