UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

Sede Amministrativa del Dottorato di Ricerca

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO
Sede convenzionata

Dipartimento Univ. Clinico di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo

I.R.C.C.S. BURLO GAROFOLO

XX CICLO **del**
Dottorato di Ricerca in

Medicina materno-infantile, pediatria dello sviluppo e dell'educazione, perinatologia

(**Ssd: Area 06-Scienze Mediche MED/38-pediatria generale e specialistica**)

Interattori molecolari nel controllo della tolleranza immune

Dottorando:

Dott. Fortunato Ferrara

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Alessandro Ventura
(Università di Trieste)

Tutore e Relatore:

Dott. Alberto Tommasini
(Università di Trieste)

Anno Accademico 2006-2007

-Interattori molecolari nella tolleranza immune –

Scopo della Tesi……pag. 5

Introduzione……...pag. 6

1 L'omeostasi del sistema immunitario

1.1 Il dinamismo del sistema immunitario

1.2 La tolleranza centrale. Il ruolo della delezione clonale e dell'anergia.

1.3 La tolleranza periferica: le cellule T regolatorie

1.4 Il caso esemplare dell'IPEX

2 Foxp3

2.1 *Foxp3* come gene per le cellule T regolatorie

2.2 Il programma molecolare e funzionale mediato da Foxp3

2.3 Studio molecolare di Foxp3

2.3.1 L'organizzazione in domini funzionali di Foxp3

2.3.2 L'oligomerizzazione di Foxp3

2.3.3 Foxp3 ed i suoi partner nella tolleranza: NFAT

2.3.4 Foxp3 ed i suoi partner nella tolleranza: AML1/RUNX1

2.3.5 Foxp3 ed i suoi partner nella tolleranza: HAT e HDAC

2.4 I geni sotto controllo di Foxp3

3 Lo studio molecolare delle interazioni proteiche

3.1 La precipitazione proteica

3.2 Il *phage display*

3.2.1 Caratteristiche generali

3.2.3 La selezione della *open reading frame*

3.2.2 Applicazioni

3.2.4 Il vettore pPAO

3.3 L'utilizzo di un sistema doppio ibrido in batteri

Risultati……pag. 30

Intoduzione ai risultati

1 Foxp3 ed isuoi domini funzionali in forma ricombinante

1.1 Strategia di amplificazione

1.2 Clonaggio nei vettori di espressione

1.3 Prove di espressione e di purificazione di Foxp3 ricombinante

2 Saggi di coprecipitazione

3 Saggi di immunoprecipitazione

3.1 Reattività di anticorpi commerciali

3.2 Immunoprecipitazione

4 Librerie anticorpali fagiche per selezionare nuovi anti-Foxp3

4.1 Caratteristiche della libreria anticorpale fagica

4.2 Selezione di anticorpi fagici Foxp3 specifici

5 Selezione di librerie di frammenti di cDNA per la ricerca di nuovi interattori mediante phage display

5.1 Costruzione della libreria fagica

5.2 Strategia di selezione

5.3 Analisi informatica delle sequenze

5.4 Verifica delle interazioni mediante saggio *in vitro*

5.5 Verifica di interazione mediante doppio ibrido batterico

5.6 Prova di identità dell'interattore

Discussione……..……pag. 57

Materiali e Metodi……pag. 62

Bibliografia……..pag. 71

-Scopo della Tesi –

Il lavoro svolto nel corso del Dottorato nasce nell' Istituto di Ricerca e Cura a Carattere Scientifico "Burlo Garofolo". Lavorare in tale tipo di struttura porta a considerare la ricerca bio-molecolare, che vi si svolge, con una finalità di tipo applicativo. Una ricerca che possa portare alla messa a punto di nuovi approcci terapeutici o di nuovi strumenti clinico-diagnostici, anche per malattie rare, che pertanto non godono di grosse risorse per il loro studio ed approfondimento.

Tra le principali linee di ricerca vi è lo studio delle malattie autoimmuni. Solitamente si tratta di patologie complesse, che coinvolgono numerosi geni e sono influenzate sia da fattori ambientali che genetici. In generale, i geni associati con l'autoimmunità non sono responsabili direttamente dello sviluppo della malattia ma costituiscono piuttosto una condizione di predisposizione [1].

Recentemente si sono identificate delle alterazioni nella funzione di un fattore trascrizionale, Foxp3 (*Forkhead Box P3*), che conducono ad una sindrome caratterizzata dallo sviluppo precoce di numerose patologie autoimmuni e allergiche (*Syndrome of Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked, IPEX*). Sebbene sia una patologia rara, questa malattia appare particolarmente interessante come prototipo di un disturbo generalizzato della tolleranza immune. Lo studio della biologia della proteina FoxP3 e delle sue interazioni e funzioni può quindi portare ad una migliore comprensione dei meccanismi con cui di solito la tolleranza immunologica è sia indotta che mantenuta.

Principale scopo di tale Tesi è proprio indagare i meccanismi molecolari che portano all'attivazione del fattore trascrizionale FOXP3, riconoscere e caratterizzare i suoi interattori proteici. In tal modo, si possono identificare altri potenziali bersagli per interventi terapeutici che possono essere utilizzati non solo per i soggetti affetti da IPEX, ma anche per i pazienti affetti da patologie ad interesse immunologico che presentano simili meccanismi di attivazione.

-Introduzione-

> […] Pensi tu ch'ei si sarebbe messo a cercare e ad apprendere cotesto ch'ei pensava sapere già, se innanzi non entrava in dubbio, fatto accorto di sua ignoranza, e se desiderio di sapere nol pungeva?
> *Platone*, *Il Menone.*

1 L'omeostasi del sistema immunitario

1.1 Il dinamismo del sistema immunitario

La sfida quotidiana del sistema immunitario degli organismi più evoluti è garantire l'identificazione e la discriminazione tra antigeni estranei, potenzialmente dannosi, e antigeni autologhi, *self*, appartenenti all'organismo stesso [2]. Altro aspetto chiave è riconoscere e tollerare tutta la serie di molecole non patogene, a cui è cronicamente esposto l'organismo, sopprimendo le risposte immuni aberranti o eccessive contro innocue sostanze ambientali (reazioni allergiche), contro batteri commensali (malattie infiammatorie croniche) o contro le proteine autologhe (malattie autoimmuni).

La tolleranza non è un fenomeno statico, ma si deve adattare allo sviluppo dell'organismo. Questo, infatti, va incontro ad una serie di cambiamenti, che prevedono la modifica o la comparsa di nuove componenti molecolari, generate dall'espressione di determinati geni in risposta a nuovi stimoli o a fasi di sviluppo (ad esempio durante la maturazione cellulare, la comparsa del feto durante la gravidanza…). Oltre al cambiamento intrinseco dell'organismo, il sistema immunitario si deve adattare al cambiamento dell'ambiente microbico e non microbico con cui viene continuamente in contatto.

Il meccanismo della tolleranza è pertanto un processo piuttosto delicato e complesso, evolutosi in modo da garantire una efficace protezione contro le infezioni, evitando, al tempo stesso, la propria autodistruzione ad opera dei linfociti autoreattivi capaci di riconoscere antigeni autologhi e di dare luogo, quindi, a reazioni autoimmuni.

Approssimativamente il 3% della popolazione mondiale è affetta da disordini autoimmuni [3], e meccanismi di origine autoimmune, ancora poco chiari, potrebbero contribuire allo sviluppo di altre comuni patologie.

Molte patologie autoimmuni hanno la loro causa principale nella fallita tolleranza da parte dei linfociti T. Alla base della tolleranza linfocitaria ci sono diversi livelli in cui le cellule vengono controllate, affinché vi sia l'eliminazione di quelle potenzialmente autoreattive,

grazie a meccanismi selettivi che possono essere considerati gli stessi, sia per gli antigeni estranei (ad esempio alimentari), sia per gli antigene autologhi. Si parla di **tolleranza centrale**, che si verifica dalle prime fasi di maturazione dei linfociti a livello del timo, e di **tolleranza periferica**.

1.2 La tolleranza centrale. Il ruolo della delezione clonale e dell'anergia.

La tolleranza centrale consiste, principalmente, nel passaggio dei linfociti, ancora immaturi, attraverso gli organi linfoidi primari. Le cellule pre-T (timociti) nel timo subiscono un severo processo di selezione, durante il quale il 95% di tali cellule vengono eliminate [4].

I pre-timociti esprimono sulla loro superficie il proprio recettore di membrana (TCR), il quale "esamina" il timo, ricercando antigeni affini presentati dal sistema maggiore di istocompatibilità (MHC), situato sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APC). Il TCR si sviluppa in modo da riconoscere in maniera specifica MHCI e MHCII, favorendo in tal modo lo sviluppo dei pre-T in CD8+ o CD4+ [5]. Le cellule epiteliali timiche, che fungono da APC, grazie all'attivazione del fattore trascrizionale timico AIRE (*autoimmune regulator*), esprimono in piccola quantità gli auto-antigeni appartenenti ai diversi organi [6]. Quasi la totalità degli auto-antigeni presenti a livello periferico sono presentati nel timo. Se il TCR di una cellula T immatura lega con bassa affinità un auto-antigene, presentato da MHC, riceve un segnale per proseguire la sua maturazione, andando pertanto incontro ad una **selezione positiva** [7]: questa cellula in periferia non avrà la possibilità di reagire contro le stesse molecole self su cui si è selezionata, ma avrà un'elevata probabilità di riconoscere piccoli cambiamenti di queste, dovuti all'interazione con antigeni periferici.

Le cellule T immature che, diversamente, riconoscono gli antigeni autologhi con alta affinità ricevono uno stimolo eccessivo, che porta la cellula ad andare incontro ad **apoptosi** (morte cellulare programmata); si parla pertanto di selezione negativa, o **delezione clonale.** Se l'interazione del TCR non è abbastanza forte da indurre l'eliminazione del pre-linfocita, ma produce uno stimolo intermedio tra la selezione positiva e quella negativa, invece di essere deleti, i pre-timociti acquisiranno un fenotipo di tipo **anergico**. A livello periferico tali cellule avranno una scarsa proliferazione ed una bassa produzione di citochine a seguito della stimolazione del proprio TCR. L'induzione dell'anergia è un processo attivo

che, almeno nelle cellule T mature periferiche, può essere provocato da un segnale Ca^{2+} dipendente continuo, generato dall'induzione costante operata via TCR. Questo forte segnale operato dal Ca^{2+} porta ad attivare proteine appartenenti alla famiglia dei fattori trascrizionali NFAT senza il coinvolgimento del loro normale partner di interazione AP-1 (l'eterodimero formato da Fos-Jun) [8].

Poiché non tutti i geni codificanti per antigeni autologhi sono attivati da AIRE nel timo, alcune cellule T immature autorettive non incontrano il rispettivo autoantigene, sfuggendo, in tal modo, alla delezione o all'anergia, migrando verso gli organi linfoidi periferici [9]. A livello periferico queste cellule T sono potenzialmente autoreattive e, se non adeguatamente soppresse, possono dare luogo a reazioni autoimmuni.

Un segnale **costimolatorio** è inoltre necessario per indurre la risposta immune, fungendo da ulteriore controllo per evitare risposte immunitarie incontrollate da parte dei linfociti T *naive* periferici. Questo segnale di "sicurezza" è garantito dai recettori costimolatori come il CD28, il recettore ICOS (*inducibile T-cell co-stimulator*) e CTLA4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) presenti sulla membrana dei linfociti T. Questi recettori di membrana interagiscono con i ligandi omologhi presentati dalle APC. CD28 e ICOS generano segnali che favoriscono l'attivazione delle cellule T, mentre CTLA4, generalmente, conduce a un segnale di inibizione dell'attivazione delle cellule T [10].

Nelle cellule T periferiche, l'AP-1 è indotto dal segnale mediato dal CD28, e le risposte immuni produttive sono dipendenti dal legame NFAT/AP-1 che forma un complesso cooperativo, capace di legarsi su specifiche sequenze di DNA poste all'interno delle regioni promotrici di alcuni geni. Tra questi vi sono sequenze geniche codificanti per fattori direttamente coinvolti nella risposta immune, come IL-2, uno dei principali fattori di crescita per le cellule T, e la catena alfa del recettore per l'IL-2 (CD25). Al contrario, l'anergia presenta un distinto "programma trascrizionale" svolto da NFAT in assenza di AP-1, tale da rendere incapaci le cellule T di organizzare e allestire una risposta proliferativa a seguito dell'ingaggio del TCR, diminuendo la produzione di IL-2 e non consentendo il loro differenziarsi in cellule effettrici attive, capaci di produrre citochine come IFN-γ o TNF-α, ma esprimendo livelli elevati di IL-10, una potente citochina antinfiammatoria. Lo stato anergico nelle cellule T è caratterizzato da un chiaro aumento della soglia di attivazione del TCR ed è attivamente mantenuto da continua stimolazione, sottosoglia, del TCR. Fornire IL2 esogena, unita ad una forte stimolazione TCR/CD28, può

rompere lo stato di anergia e portare ad una attivazione produttiva delle cellule T anergiche. Da questo punto di vista l'induzione dell'anergia può essere considerato come un caso speciale di regolazione intrinseco alla cellula.

1.3 Tolleranza periferica. Le cellule regolatorie.

Un sottogruppo specializzato di linfociti T CD4+ svolge un ruolo chiave nella tolleranza periferica. Queste cellule, denominate **linfociti T regolatori** (Treg), prodotte anch'esse durante la selezione timica [11], hanno il ruolo fondamentale di controllare e sopprimere la reattività contro il *self* delle cellule T effettrici a livello periferico, poiché la selezione timica non sempre elimina completamente le cellule T autoreattive [12]. Le cellule Treg possono anche svilupparsi *de novo* a livello periferico da precursori che non derivano direttamente dalla cellule Treg prodotte dal timo [13].

Le cellule Treg, inizialmente caratterizzate da alti livelli di espressione del CD25 sulla superficie cellulare, costituiscono il 5-10% delle cellule T CD4+ periferiche. Presentano una bassa espressione costitutiva del CTLA-4, che sembra giocare un ruolo chiave nella loro attività di soppressione [14]. Un ulteriore marker di superficie delle cellule T regolatorie è il GITR (*glucocorticoid-induced TNF-receptor-related*), che sembra svolgere un ruolo nell'attenuazione dell'attività delle cellule Treg, oltre a rendere le cellule T effettrici meno suscettibili alla soppressione [15]. Queste molecole di superficie, sebbene caratterizzino le cellule Treg, non sono esclusive di questo sottogruppo di linfociti. Il miglior marker molecolare per le cellule T regolatorie risulta essere il fattore trascrizionale Foxp3 (codificato sul cromosoma X) essenziale, inoltre, per il loro sviluppo (timico o periferico).

Le Treg hanno spiccate "caratteristiche anergiche", tendono a non proliferare ed in risposta allo stimolo del proprio TCR sono restie a produrre IL-2, sebbene siano completamente dipendenti da questa citochina per la loro sopravvivenza [12]. L'attività regolatoria svolta dalle cellule Treg è un meccanismo piuttosto complesso, incentrato principalmente sul diretto contatto tra cellule Treg e T effettrici (Teff), necessario per la soppressione, altri gruppi cellulari sembrano giocare un ruolo in questa complicata attività: cellule APC e linfociti B, oltre ad altri tipi di linfociti T [16].

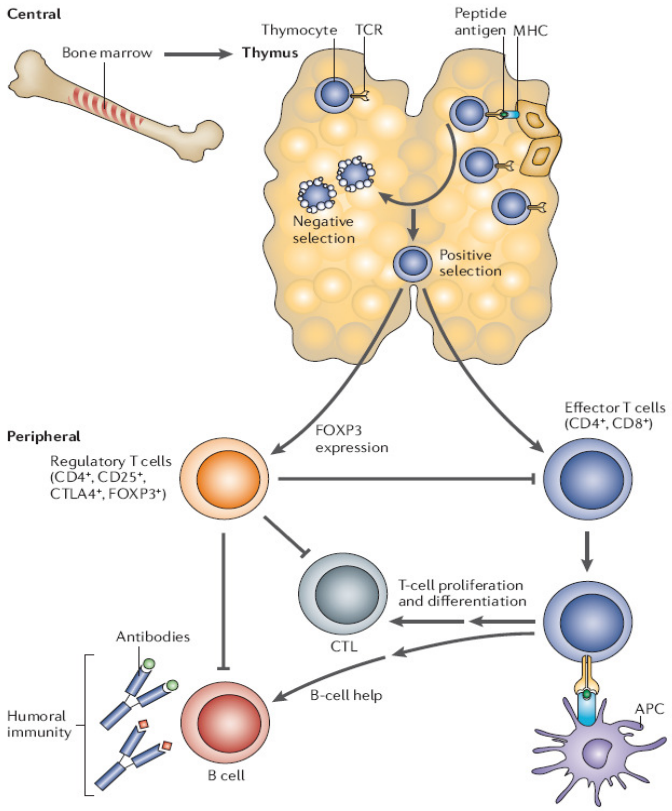

Fig.1 Meccanismi della tolleranza centrale e periferica. I timociti subiscono processi di maturazione e selezione nel timo: quelli altamente reattivi contro le componenti autologhe presentate tramite MHC vengono deleti. In maniera simile, i timociti non funzionali vanno in apoptosi. I timociti selezionati positivamente migrano verso la periferia come cellule T mature. La maggior parte darà luogo a cellule T CD4+ e CD8+ effettrici, e medieranno la risposta immune sia umorale che cellulare. Una piccola percentuale di cellule T esprimono il fattore trascrizionale FOXP3 ed evolvono in cellule T regolatorie CD4+ CD25+ e CTLA4+ (cellule Treg naturali). Una volta giunta a livello periferico, queste cellule sono mediatori chiave della tolleranza periferica. Il meccanismo di azione delle cellule Treg include diversi processi a diversi livelli della risposta immune.

1.4 Il caso esemplare dell'IPEX

Le cellule Treg giocano un ruolo estremamente importante nel controllo del sistema immunitario. La mancanza di questo fondamentale sottogruppo di linfociti T porta alla comparsa di una grave malattia autoimmune, la sindrome IPEX (*Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked*). La patologia è dovuta ad una difettosa regolazione dei meccanismi di tolleranza immunitaria, con la conseguente attivazione incontrollata della risposta contro i diversi componenti dell'organismo (autoimmunità) e contro antigeni esterni (allergia).

In passato erano stati osservati, indipendentemente tra di loro, casi di neonati con varie combinazioni di enteropatie severe associate con diabete di tipo I, eczema, ipotiroidismo, dermatite diffusa, diarrea intrattabile ed altri disordini immuno-mediati (anemia emolitica, piastrinopenia, nefrite, epatite, alopecia areata…), condizioni di per sé abbastanza rare nell'infanzia, ancora più rare se presenti contemporaneamente nello stesso soggetto. I soggetti affetti erano tutti maschi, la cui maggioranza moriva nei primi mesi di vita, quasi tutti entro i 3 anni, nonostante una forte terapia di tipo immunosopressivo [17].

La predominanza di soggetti di sesso maschile ed una familiarità nei figli maschi per linea materna, avevano suggerito un'eredità recessiva legata al cromosoma X. Nel 1982 [18] fu registrato il caso di una famiglia numerosa, con un chiaro *pattern* X recessivo di eredità e variabilità di espressione e severità tra i figli affetti. In alcuni pazienti l'aggravamento della malattia sembrava correlato agli eventi che andavano a stimolare il sistema immunitario.
Un modello animale, che mostrasse analogie con questa condizione patologica, era noto fin dal 1949. Il topo *scurfy* [19], infatti, presenta una patologia multiorgano a rapida evoluzione, ben presto identificata come dipendente da un'attività incontrollata di cellule CD4+, di cui le cause scatenanti sono rimaste a lungo ignote. La "somiglianza" tra il modello murino e questa potenziale nuova condizione clinica identificata, hanno dato nuova linfa alla ricerca delle cause.
A metà degli anni novanta attraverso analisi di mappatura e di sequenziamento è stato identificato il gene responsabile della patologia nel topo e si è identificato il gene umano omologo: *Foxp3* [20]. Ben presto si sono identificati, nelle mutazioni di questo gene, i responsabili del manifestarsi di questa grave sindrome, denominata appunto IPEX, anche nell'uomo. Lo svilupparsi in maniera assai precoce di disturbi, di chiara origine autoimmune, ha fatto subito supporre che la proteina prodotta da questo gene fosse implicata nel controllo della tolleranza immunologia.
Si è subito compreso come la malattia può costituire un prototipo fondamentale per lo studio della tolleranza immune e come lo studio della funzione di FOXP3 sia fondamentale per comprendere i meccanismi chiave per l'immunologia di base.

2 Foxp3

2.1 *Foxp3* come gene chiave per le cellule T regolatorie

Il gene *Foxp3* è stato identificato grazie all'analisi combinata mediante genetica ad alta risoluzione e mappatura fisica con analisi di sequenze su larga scala [21, 22]. *Foxp3* è risultato essere il gene difettivo nel modello animale della sindrome IPEX, il topo *scurfy*, [23], grazie a cui è stato possibile investigare il suo contributo nello sviluppo e/o funzione nelle cellule Treg del modello murino [24]. Nei topi sani l'espressione di *Foxp3* è stabile e costitutiva, maggiore nelle cellule Treg, bassa nelle cellule CD4+CD25- e quasi assente nelle cellule CD4-CD8+. L'espressione indotta di *Foxp3*, sotto forma di transgene nei topi o mediante vettore retrovirale in cellule CD4+CD25-, è responsabile dell'acquisizione di proprietà soppressive nelle cellule T non regolatrici [25] e ciò è stato dimostrato anche per celle T CD4+ *naive* umane. Le cellule, così trattate, acquistano un fenotipo di tipo Treg, associato a bassi livelli di espressione delle citochine (se paragonati con cellule non trattate o di controllo). Le cellule Treg indotte mostrano, inoltre, un'attività soppressoria *in vitro* dipendente dal contatto cellulare e, *in vivo*, sono efficaci nell'attenuare fenomeni autoimmuni ed infiammatori [24]. *Foxp3* risulta quindi il gene responsabile dello sviluppo e della funzione delle cellule Treg, oltre ad essere il loro *marker* molecolare più specifico.
Questi risultati implicano che la realizzazione di un programma per la formazione di cellule Treg funzionanti dipende da Foxp3, e questo *pathway* molecolare è distinto da quello che porta alla formazione delle cellule Th1, Th2 o T memoria. L'espressione endogena di *Foxp3* è stata specialmente osservata nelle cellule Treg periferiche e nei timociti CD25+CD4+CD8-. In altri timociti (sottogruppi di cellule T, cellule B, cellule natural killer, o cellule natural killer T) [26] vi è scarsa o assente espressione di *Foxp3*, mentre le cellule T *naive* attivate o differenziate come cellule T *helper* di tipo 1 o 2 non presentano espressione di *Foxp3*.
Foxp3 è cruciale per lo sviluppo delle cellule Treg nel timo, mentre ancora poco chiaro è il suo ruolo nel garantire il fenotipo regolatorio nelle cellule T periferiche. Per chiarire questo aspetto si sono utilizzate cellule periferiche Treg la cui produzione di Foxp3 può essere modulata grazie ad un allele *Foxp3* condizionale. Se viene indotta l'eliminazione della proteina, vi è la perdita delle funzioni soppressorie e delle caratteristiche fenotipiche delle cellule Treg, mentre acquisiscono la capacità di produrre IL-2 e citochine pro-

infiammatorie. Questo cambiamento nelle proprietà funzionale è accompagnato anche dall'alterazione di un numero di geni la cui trascrizione è sotto il controllo di Foxp3 [27]. I meccanismi epigenetici e la rete di fattori trascrizionali messi in campo da Foxp3 durante la differenziazione delle cellule Treg sono incapaci di mantenerne la piena funzionalità senza la continua espressione di Foxp3 stesso.

2.2 Il programma molecolare e funzionale mediato da Foxp3

La differenziazione delle cellule Treg, come già accennato, avviene nel timo, grazie all'induzione dell'espressione di *Foxp3* in una sottopopolazione di timociti che presentano un TCR con un'aumentata affinità per i peptidi autologhi esposti dell'MHC delle APC. In aggiunta a questo primo stimolo, il segnale costimolatorio generato dal CD28 facilita la differenziazione delle cellule Treg dipendente da Foxp3 [28].

I timociti che esprimono Foxp3 mostrano le stesse caratteristiche peculiari delle cellule Treg periferiche mature, inclusa la funzione soppressoria. Sebbene sulla superficie delle cellule Treg sia presente una grossa quantità di CD25, queste risultano incapaci di produrre IL-2, ciò rende la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule Treg dipendente dall'IL2 prodotta dalle cellule T non regolatorie [12]. In aggiunta a ciò. le cellule Treg non producono citochine che promuovono la risposta immune tipica delle cellule Th1 e Th2. Questa differenza è essenziale per il mantenimento dell'omeostasi immunitaria, vista l'espressione di TCR autoreattivi potenzialmente patogenici sulla superficie della maggior parte delle cellule T reg [29].

Per meglio comprendere il contributo apportato da Foxp3 alla differenziazione delle cellule Treg, è stata inserita la sequenza codificante della proteina fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) all'interno del locus genico di Foxp3. In tal modo è possibile sospendere l'espressione di Foxp3 a favore della produzione di GFP, e le cellule in cui questo avviene sono facilmente identificabile grazie all'acquisizione di fluorescenza. Nel topo, queste cellule hanno mostrato caratteristiche: quali incapacità di produrre l'IL-2 e le citochine Th1 e Th2; elevata espressione di CD25; stato di anergia; dipendenza dall'IL-2 esocrina, che sono tipiche delle cellule Treg e che si ritenevano sotto controllo esclusivo di Foxp3. Questi risultati dimostrano che l'attribuzione del programma Treg nel timo non necessita dell'espressione di FOXP3. Le cellule così ottenute erano però incapaci di

funzione soppressoria, ad indicare che mentre questa invece dipende dall'espressione di un FOXP3 funzionale.

Evidentemente il ruolo di Foxp3 è necessario per amplificare o rendere più stabili comportamenti cellulari probabilmente innestati dalla stimolazione cronica del TCR. A conferma di tale ipotesi, si è visto come gli effetti principali della presenza di Foxp3 siano un'aumentata espressione del CD25 e dei marker tipici delle Treg come CTLA4 e GITR, oltre che una stabilizzazione dello stato anergico; soprattutto la funzione la funzione soppressoria si è dimostrata essere esclusivamente dipendente dall'espressione di Foxp3. Anche l'attività proliferativa delle cellule Treg è Foxp3 dipendente, garantendo alle cellule Treg differenziate di non evolvere in uno stato quiescente. Perciò, al contrario dell'effetto anti-proliferativo di Foxp3 osservato nell'espressione forzata di tale gene nelle cellule T non regolatorie, lo stesso conferisce un potenziale proliferativo superiore alla cellule Treg differenziate, caratteristica fondamentale per la loro funzione *in vivo* [30].

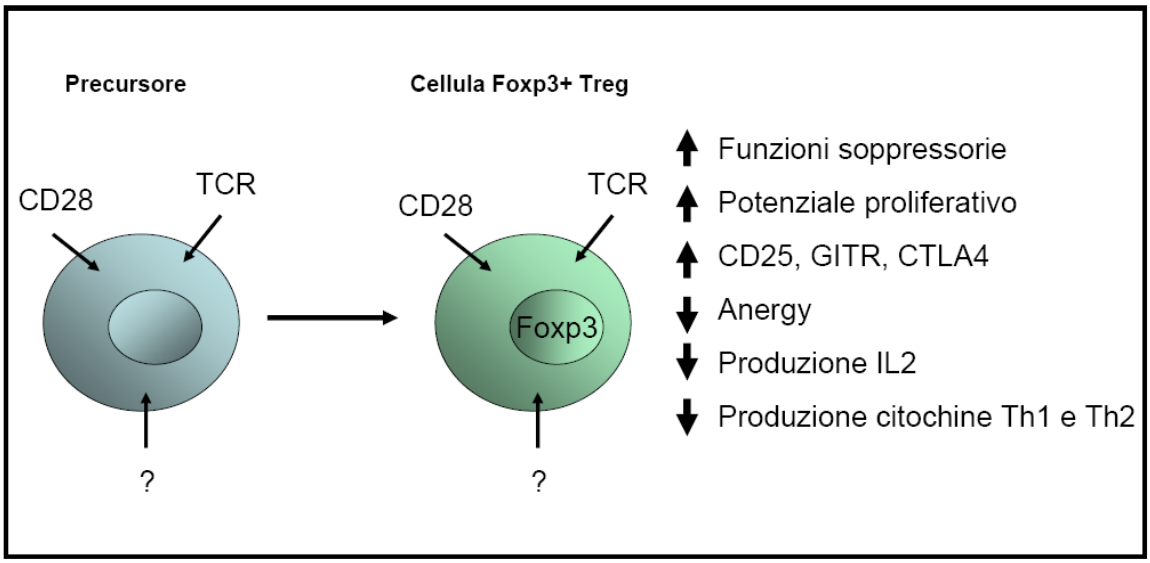

Fig.2 L'induzione di Foxp3 in cellule precursore del timo è facilitata dall'attività del TCR ad alta affinità, assieme al segnale addizionale inviato attraverso il CD28 ed altri segnali ancora poco compresi. L'espressione di Foxp3 determina un aumento delle caratteristiche peculiari delle cellule regolatorie e ne attenua altre.

2.3 Studio molecolare di Foxp3

La genesi delle cellule Treg è un processo biologico innestato dai messaggi ricevuti a livello della membrana cellulare dai pre-linfociti (mediante TCR ad alta affinità, costimolazione recettore CD28…) che arriva, tramite trasduzione del segnale, ad indurre l'espressione e l'attivazione di Foxp3 a livello nucleare. Capire i meccanismi associati con l'attivazione di *Foxp3* e le funzioni ad esso correlate presenta indubbio interesse terapeutico. Vi sono, infatti, evidenze di come l'aumentata espressione di Foxp3 e la conseguente attivazione delle cellule Treg, in alcune patologie di tipo autoimmune, come l'artrite idiopatica giovanile, siano associati a fenotipi di malattia meno severi [31]. In più, livelli aumentati di espressione di Foxp3 e del numero delle cellule Treg si sono osservati in melanomi in linfonodi contenenti metastasi, dove l'elevato numero di cellule regolatorie sembra contrastare la possibile reazione immunologica contro le cellule tumorali [32].
Perciò, la comprensione del processo di induzione di Foxp3 e del suo funzionamento come fattore trascrizionale nelle cellule Treg può portare ad un approccio razionale per utilizzare le cellule regolatorie per scopi terapeutici.

2.3.1 L'organizzazione in domini funzionali di FOXP3

Il gene *Foxp3* codifica per un fattore trascrizionale appartenente alla famiglia dei geni *Fox.* In generale, i fattori trascrizionali giocano un ruolo importante nella proliferazione, nella differenziazione e nello sviluppo cellulare [33].
La proteina Foxp3 umana è una proteina di 47KDa, appartenente alla famiglia di fattori trascrizionali *Forkhead* (composta da più di 100 membri), così definita per la presenza di un dominio capace di legare il DNA, denominato appunto, *forkhead* (FKH).
I membri della famiglia *Fox* svolgono funzioni sia di repressione che di attivazione della trascrizione genica. In generale, i fattori trascrizionali eucariotici, oltre che dal dominio deputato al legame con specifiche sequenze nucleotidiche, sono composti anche da altri domini strutturali e funzionali [34]. La struttura tridimensionale dell'intera proteina Foxp3 non è stata ancora completamente descritta, ma il suo caratteristico dominio FKH ha una somiglianza del 45% con un dominio analogo presente nel fattore trascrizionale Foxo4, dell'80% con un dominio di Foxp1, del 73% con quello di Foxp2 e del 75% con quello presente in Foxp4. La struttura tridimensionale di tali fattori trascrizionali è stata risolta e caratterizzata mediante tecniche di cristallografia [35].

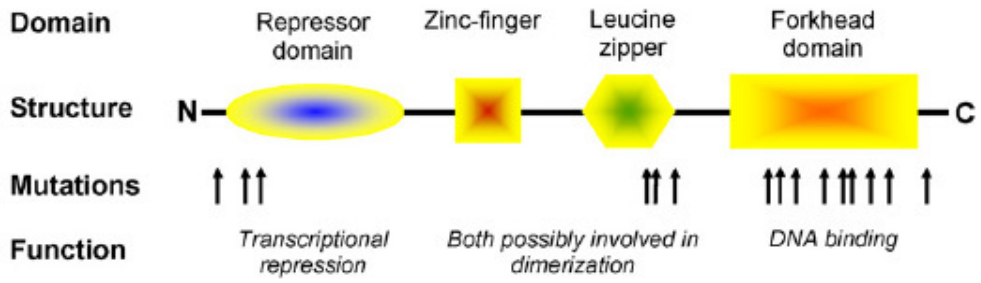

Fig.3 Rappresentazione schematica di Foxp3. Oltre al ben noto dominio FKH ed alla sua capacità di legame con il DNA. La proteina è composta da altri domini con specifiche funzioni. Le mutazioni che caratterizzano i pazienti IPEX sono principalmente concentrati nel dominio FKH.

Oltre al dominio funzionale FKH, Foxp3 presenta all'N-terminale, un tipico dominio di repressione trascrizionale, seguito da un motivo strutturale C2H2 detto a dito di zinco (*zinc finger* - Zinc). La parte C-terminale della proteina è caratterizzata da dominio *leucine zipper* (LeuZIp) e dal già citato dominio *forkhead* [36]. I domini Zinc e LeuZip hanno entrambi la potenzialità di interagire con il DNA così come di indurre la formazione di complessi proteici mediante dimerizzazione [37].

I domini LeuZip, Zinc e FKH sono conservati tra tutti i membri della sottofamiglia Foxp mentre è peculiare di Foxp3 il dominio N-terminale, che si suppone abbia un preciso significato biologico per le cellule Treg. Fondamentale per la funzionalità di Foxp3 è il dominio FKH, situato, a dispetto delle altre proteine Foxp, all'estremità C-terminale (Ziegler). L'importanza di tale dominio funzionale è sottolineata anche dall'osservazione che la maggior parte delle mutazioni a carico di Foxp3 trovate nei pazienti IPEX sono localizzate all'estremità C-terminale ed in particolare nel dominio FKH, suggerendo che la sua specifica attività di legame del DNA è necessaria per lo sviluppo ed il funzionamento delle cellule Treg [38]. Indispensabile risulta anche l'integrità del dominio LeuZip, all'interno della cui sequenza sono state descritte due mutazioni in pazienti IPEX. Tale dominio sembra garantire i processi di omo- ed etero-dimerizzazione di Foxp3, che risultano a loro volta indispensabili per il corretto funzionamento delle cellule Treg e, quindi, per evitare l'insorgenza della malattia [39].

2.3.2 L'oligomerizzazione di Foxp3

L'oligomerizzazione delle proteine gioca un ruolo critico nella funzione fisiologica di molti fattori trascrizionali, come p53 [40] e STAT5 [41]. Inoltre, è stato notato come eventuali dimeri o tetrametri di una determinata proteina svolgano attività trascrizionali diverse. Ad esempio p53 può svolgere attività di attivazione, quando presente in forma

dimerica, mentre, come repressore tumorale, è spesso identificato in forma tetramerica capace di legare stabilmente i geni bersaglio [40].

L'abilità dei fattori di trascrizione di interagire tra di loro, sia in maniera cooperativa che competitiva, fornisce alle cellule dei mammiferi un livello più complesso di regolazione trascrizionale in risposta ai diversi stimoli ambientali ed ai segnali di sviluppo [42].

I membri della famiglia Foxp sono stati analizzati per la loro capacità di formare dimeri, oligomeri o anche complessi più grandi [39]. Le proteine murine Foxp1, Foxp2 e Foxp4, infatti, possono dar luogo alla formazione sia di etero che omodimeri per il legame con il DNA [39]. Il ruolo svolto dal dominio Zinc, altamente conservato tra le proteine del gruppo Foxp, nella formazione di questi complessi molecolari non è stato mai studiato in maniera approfondita.

La proteina Foxp3 può dar luogo ad eterodimero con la proteina Foxp1, *in vitro*, oltre che formare omotetrameri [39]. Per la formazione di questi complessi molecolari gioca un ruolo fondamentale il domino LeuZip. A prova di ciò, la mutazione nota E251 a livello del dominio LeuZip, caratteristica di alcuni pazienti IPEX, che porta ad una singola delezione amminoacidica, è sufficiente ad impedire l'omotetramerizzazione di Foxp3. Tale mutazione porta ad una diminuita associazione tra Foxp3 ed il promotore per *Il-2*, sia *in vitro* che *in vivo*, limitando la repressione della trascrizione di IL-2 dopo l'attivazione delle cellule Treg. Tale complesso risulta, pertanto, necessario per lo sviluppo corretto sviluppo e funzione delle cellule Treg.

2.3.3 Foxp3 ed i suoi partner nella tolleranza: NFAT

Sebbene l'intera composizione dei possibili complessi trascrizionali, attivanti ed inibenti, formati da FOXP3 rimanga sconosciuta, l'interazione tra Foxp3 ed NFAT1 (NFATc2) svolge un'importante azione di regolazione dell'espressione genica e della funzione delle cellule Treg . L'interazione tra i due fattori trascrizionali è di tipo fisico, focalizzato nel dominio FKH [43]. Il rapporto tra le due proteine viene meno quando sono presenti le mutazioni IPEX tipiche di questo dominio funzionale, sviluppando una meno efficace repressione del gene *Il2*, una diminuita espressione del CD25 e la conseguente perdita delle capacità soppressoria delle cellule Treg. Ciò implica che l'attività trascrizionale del complesso Foxp3-NFAT è importante per la differenziazione e per la funzione delle cellule Treg. Affinché questa interazione proteina-proteina mantenga un'attività soppressoria, Foxp3 necessita, oltre che al dominio FKH, anche della zona N-terminale e del dominio

LeuZip, molto probabilmente per garantire interazione proteina-proteina con altri fattori trascrizionale e per la propria omo-dimerizzazione.

Dopo attivazione, nelle cellule che esprimono Foxp3, è rilevabile la presenza del complesso Foxp3/NFAT in corrispondenza delle regioni dei promotori di *Il-2* e *Il-2ra*. In particolare, le due proteine inibiscono la produzione di IL2 mediante legame con la specifica regione regolatoria, parzialmente sovrapposta al sito di legame del complesso NFAT/AP-1, che normalmente ne incrementa la produzione [44]. Questo porta ad ipotizzare una competizione tra i due macchinari trascrizionali, indispensabile per la generazione delle cellule Treg, sebbene i domini di NFAT che interagiscono con AP-1 non siano gli stessi che agiscono con Foxp3 [43].

Nelle cellule Treg, il complesso Foxp3/NFAT si lega a regioni promotrici di diversi geni, svolgendo un ruolo sia di repressione che di stimolo. Questa disparità di comportamento è forse dovuta alla formazione di complessi molecolari molto più articolati di cui Foxp3 ed NFAT sono solo alcuni dei protagonisti. Affinché avvenga il legame sulle regioni geniche regolatrici di Foxp3 ed NFAT, è necessario anche il segnale Ca^{2+} dipendente, modulato dalla calcineurina, a sua volta indotta dalla stimolazione del TCR [45].

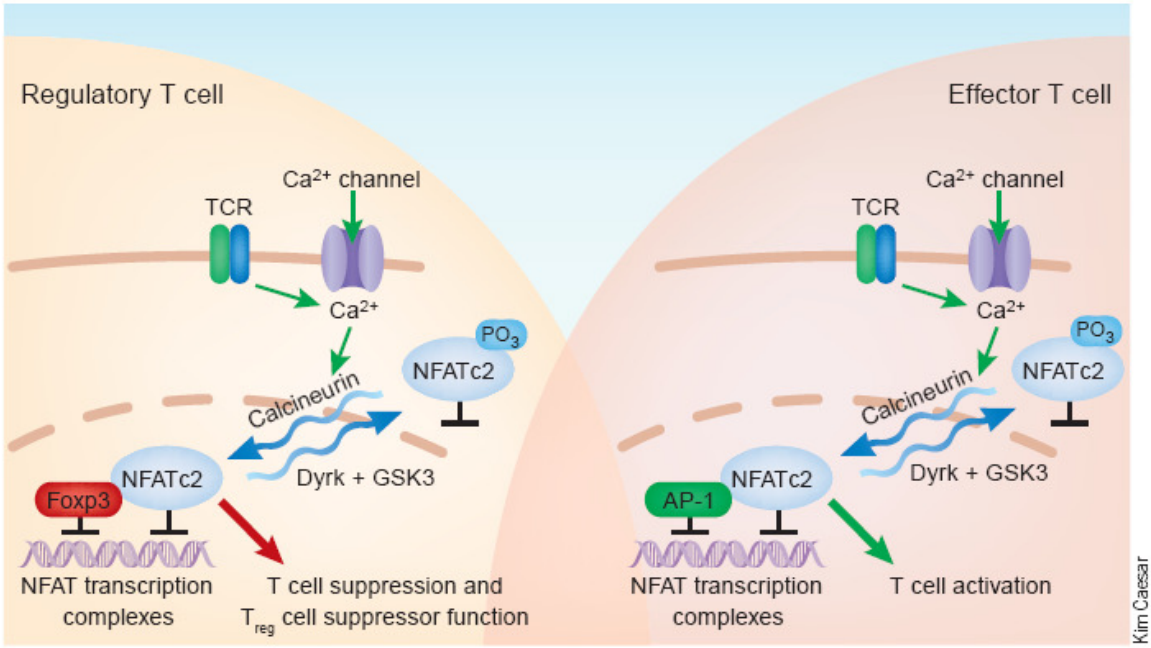

Fig.4 La differenziazione delle cellule T dipende dall'associazione tra NFAT e Foxp3 o AP-1. Nelle cellule Treg, Foxp3 interagendo in maniera cooperativa con NFATc2, guida la repressione e l'attivazione dei geni necessari per lo sviluppo e il funzionamento delle cellule Treg. Nelle cellule effettrici (destra) non vi è espressione di Foxp3, e NFATc2 coopera principalmente con AP-1, favorendo l'attivazione immunitaria.

Le interazioni tra Foxp3, NFAT e AP-1, oltre a modulare l'espressione genica, hanno un ruolo chiave nella differenziazione delle cellule T. Come accennato in precedenza, il solo stimolo del TCR porta all'induzione dell'NFAT; se tale segnale risulta essere unico, il timocita va incontro ad uno stato anergico, mentre se questa stimolazione viene associata con l'espressione di Foxp3, l'interazione tra i due favorisce la differenziazione in cellule Treg. Se gli stimoli partono esclusivamente dal solo TCR e dal CD28 (che induce la formazione di AP-1), avverrà la generazione delle cellule T capaci di dar luogo alla risposta immune [43]. In particolar modo, questo modello è applicabile alla generazione delle cellule Treg periferiche, in risposta ad una stimolazione cronica del TCR a livelli subottimali [46], associata ad alte dosi di TGF-β che possono indurre la produzione di Foxp3 nelle cellule periferiche [12]. Questo processo potrebbe complicarsi se si considera il segnale CD28 come necessario per la formazione di cellule Treg a livello periferico.
Questo interessante modello non è perfettamente adattabile alle cellule regolatorie che si sviluppano nel timo. Qui, infatti, le cellule Treg hanno un TCR con un'aumentata affinità per i peptidi autologhi legati a MHC (che normalmente porta all'anergia) e questo segnale sembra necessario per l'induzione dell'espressione di Foxp3. Inoltre lo sviluppo delle Treg nel timo è dipendente dal segnale del CD28 e da altri fattori poco conosciuti, come ad esempio il recettore per le citochine gamma-c (γR) [25]. Perciò Foxp3 ed AP-1 risulterebbero espressi simultaneamente nelle cellule Treg che si sviluppano nel timo, implicando uno scenario più complesso dipendente dalle concentrazioni relative di NFAT, AP-1, e Foxp3, così come di altri non ben identificati *partners* e cofattori di Foxp3.

2.3.4 Foxp3 ed i suoi partner nella tolleranza: AML1/RUNX1

AML1/RUNX1 è un fattore trascrizionale cruciale per il normale sviluppo ematopoietico. Il suo ruolo consiste principalmente nell'attivazione de i geni *Il2* e *INF-γ*. Nelle cellule Treg, AML1 interagisce fisicamente con Foxp3: ciò determina la soppressione dell'espressione dei due geni, favorendo sia l'aumento delle molecole associate alle cellule Treg che la loro attività soppressoria . Questo controllo trascrizionale delle funzioni delle cellule Treg mediante interazione proteica viene impiegata per il controllo delle risposte immunologiche fisiologiche e patologiche delle cellule T [47].

2.3.5 Foxp3 ed i suoi partner nella tolleranza: HAT e HDAC

Altri componenti dell'articolato complesso molecolare incentrato sulle funzioni di Foxp3 sono le acetitasi e deacetilasi istoniche (HAT e HDAC, rispettivamente). L'acetilazione

degli istoni permette il rimodellamento della cromatina, consentendo un'aumentata accessibilità del macchinario trascrizionale per promuovere l'espressione genica.

È noto che le modifiche post-trasduzionali sono un meccanismo che può alterare il funzionamento ed il posizionamento delle proteine, Foxp3, in particolare, subisce una fosforilazione, ad opera di una chinasi ignota, e subisce l'acetilazione ad opera di TIP60, una HAT che si trova fisicamente associata a Foxp3 mediante interazione con il suo dominio N-terminale. Entrambe le due proteine interagenti vanno poi a localizzarsi a livello nucleare nelle cellule Treg naturali [48].

Questa acetilasi è stata spesso associata alla presenza di una deacetilasi di classe 2, la HDAC7 [49]: le due proteine, interagendo, regolano la struttura e la funzionalità della cromatina non solo modificando gli istoni, ma anche altre proteine leganti il DNA. Il processo di rimodellamento della cromatina, guidato da HAT e HDAC, è risultato fondamentale nel differenziamento delle cellule T [50], come si deduce anche dall'evidenza che loro anomalie geniche sono state spesso associate con differenti difetti del sistema immunitario [51].

La funzione di queste proteine nella differenziazione e nel funzionamento delle cellule Treg sembra non solo ristretta al rimodellamento della cromatina, data anche la loro interazione fisica con Foxp3. Un loro, molto probabile, coinvolgimento nella localizzazione di Foxp3 sembra provato dal fatto che lo stimolo tramite TCR, *in vitro*, porta alla scissione dell'interazione Foxp3 e HDAC attivando il fattore trascrizionale e permettendone la sua localizzazione a livello nucleare. Diversi geni vengono attivati (*IL2ra, Ctla4*) o repressi (*Il2, Infg*), dalla contemporanea deacetilazione e aumentata acetilazione dell'istone H3, che si trova associato agli elementi genici regolatori su cui generalmente agisce Foxp3, che è perciò capace di reclutare il macchinario di rimodellamento della cromatina nei suoi siti di legame per permettere l'espressione regolata dei geni sotto suo controllo.

Le zone della molecola Foxp3 a cui si legano le HDAC non sono le stesse coinvolte nell'interazione con le HAT [50]. Questo porta ad un modello in cui le modifiche post-trasduzionali, operate da distinte acetiltransferasi e deacetilasi, sullo stesso fattore trascrizionale, possono avvenire non solo in siti differenti, ma anche con una tempistica diversa ed in risposta a differenti segnali molecolari; l'acetilazione potrebbe pertanto giocare un ruolo importante nella attivazione della proteina e nella possibilità di formare dei macro complessi trascrizionali.

2.4 I geni sotto controllo di Foxp3

Un ruolo fondamentale, per la sopravvivenza e lo sviluppo delle cellule Treg, è svolto dai geni la cui espressione è controllata da Foxp3 e da tutto il sofisticato macchinario molecolare a cui fa capo.

Alcuni dei geni controllati da Foxp3 hanno funzioni note o presunte nella biologia delle cellule Treg (*Il2, Il2ra, Ctla4, Tnfsr*)[52]. La loro aumentata o diminuita espressione è stata valutata confrontando le cellule Treg con le cellule T *naive* o le cellule T effettrici.

Tra gli altri geni identificati come dipendenti dalla regolazione di Foxp3, è stato individuato un sottogruppo (*Fgl2, Gzmb, Ctla4, Nt5e, Ebi3*)[25] codificante per molecole effettrici, attive anche nelle cellule T convenzionali, ma in maniera transiente ed a un grado inferiore, rispetto alle cellule Treg. Foxp3 sembra quindi in grado di conferire funzioni soppressorie amplificando e stabilizzando diversi meccanismi di regolazione negativa, che sono presenti anche nelle cellule T effettrici. Tale ipotesi implica che una deficienza in un singolo meccanismo della soppressione mediata dalle cellule Treg non risulterebbe in una lesione infiammatoria autoimmune così aggressiva e severa come quelle associate con la deficienza di cellule Treg [53].

Anche geni appartenenti al meccanismo del ciclo cellulare sono regolati dalla presenza di Foxp3. In particolare, il programma trascrizionale a cui sono sottoposti, ha spiccate caratteristiche "adattative", andando ad amplificare e stabilizzare situazioni favorevoli per le cellule regolatorie, e limitando potenziali geni svantaggiosi per la loro proliferazione e funzione (come quelli della quiescenza) o potenzialmente dannosi (come quelli che controllano le citochine tipiche dei Th1, Th2…).

Una prima analisi su larga scala dei geni sotto controllo di Foxp3 ha rilevato e confermato la sua doppia funzione, come fattore trascrizionale che aumenta, ma che anche inibisce, la sintesi di specifici geni bersaglio. La maggior parte di questi geni risulta codificare per modulatori chiave dell'attivazione delle cellule T e della loro funzione a seguito dello stimolo del TCR. La repressione (Foxp3-dipendente) è un'attività che sembra essere cruciale per il normale funzionamento delle cellule Treg. Infatti, la over-espressione di alcuni di questi geni bersaglio è spesso causa di patologie autoimmuni [45].

Un'analisi ancora più approfondita sull'intero genoma è stata condotta mediante tecnica di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP), identificando circa 700 geni con regioni regolatrici adatte per il legame di Foxp3. L'analisi su ampia scala ha evidenziato, ancora una volta, come Foxp3 abbia la doppia funzione di promozione o di soppressione della

trascrizione genica. Caratteristica è la differente regolazione a livello timico e periferico di tali geni. In particolare nel timo si sono rilevati sotto controllo di Foxp3 geni codificanti per fattori trascrizionali e geni indispensabili per il rimodellamento della cromatina stessa. Geni bersaglio di Foxp3, comuni per le cellule Treg di origine timica e periferica, sono principalmente quelli codificanti per molecole della membrana plasmatica e proteine del segnale cellulare. Questo insieme di geni mostra l'importanza del gene *Foxp3* non solo nello sviluppo timico, ma anche nella differenziazione e nella proliferazione e funzionalità a livello periferico delle cellule Treg [54].

Questa estesa analisi mette in evidenza come il programma trascrizionale di Foxp3 non riguardi solo ed esclusivamente geni funzionali, ma sia implicato anche nella modulazione dell'espressione genica di altri regolatori trascrizionali. Quanto detto finora, infatti, conferma come Foxp3 interagisca con altri fattori trascrizionali, sia interagendo direttamente a livello proteico che regolandone l'espressione genica. L'attività di tali proteine è probabilmente indispensabile per l'espressione differenziale di un numero di geni dipendenti da Foxp3, pertanto necessaria per lo sviluppo ed il funzionamento delle cellule Treg.

L'associazione di Foxp3 con alcuni fattori trascrizionali ed altri polipeptidi chiarisce il meccanismo di repressione ed attivazione di alcune proteine e di parte di meccanismi molecolari strettamente correlati con lo sviluppo delle cellule Treg. I processi biologici che rendono possibile l'induzione di questa specifica modulazione rimangono tuttavia poco chiari [55]. Per di più, recenti osservazioni, hanno mostrato come Foxp3 esista come parte integrante di un grande complesso proteico, di peso molecolare superiore ai 500KDa. Studiare ed analizzare i componenti e la dinamica di questo complesso proteico potrebbe spiegare in maniera più fine la regolazione cellulare guidata dalla cellule Treg.

3 Lo studio molecolare delle interazioni proteiche

Ricercare nuove proteine appartenenti al complicato macchinario trascrizionale di cui è a capo Foxp3 è di notevole interesse non solo biologico, ma anche terapeutico.

Diverse sono le strategie per rilevare proteine interagenti: in questa Tesi, sono state prese in considerazioni sia alcune metodiche di uso comune ampiamente impiegate nello studio dell'immunologia che nuovi approcci proteomici.

Lo studio degli interattori proteici ha diversi obbiettivi, che vanno dall'identificazione di tutte le proteine interagenti con la proteina di interesse, alla comprensione del ruolo fisiologico di questa interazione. Per questo motivo non esiste una tecnica universale per far luce sui diversi aspetti dell'interazione biologica tra due proteine.

3.1 La precipitazione proteica

È possibile produrre proteine ricombinanti di interesse in fusione con specifiche sequenze peptidiche (coda di sei istidine – *6His, Maltose Binding Protein – MBP, Glutathion-S-Transferase – GST*...). Le proteine di fusione permettono un'efficace purificazione del prodotto, grazie al loro legame con resine specifiche, ma possono essere anche utilizzate per esperimenti di coprecipitazione o *pulldown*. Un possibile complesso che si viene a formare tra proteina ricombinante e suoi interattori, può essere isolato da diverse soluzioni, proprio grazie alla proteina di fusione ed alla sua reattività verso determinate resine. Queste, infatti, permettono l'isolamento del complesso e la sua successiva analisi.

Ampiamente usata è l'immunoprecipitazione, dove l'isolamento del complesso proteina-interattore è eseguito grazie all'utilizzo di anticorpi monoclonali. Il forte legame che si forma tra gli anticorpi (Ab) ed il loro antigene specifico (Ag) permette di isolare tale complesso a cui, in particolari condizioni, rimangono associate anche le altre proteine eventualmente legate fisicamente con l'Ag stesso.

3.2 Il phage display

3.2.1 Caratteristiche generali

L'esposizione sulla superficie di fagi filamentosi è una tecnologia dalle diverse potenzialità, tra cui quella di caratterizzare interazioni proteiche. Il fago M13 è un fago filamentoso composto da un DNA a singolo filamento (6407 nucleotidi), il cui capside è costituto da circa 2700 copie della proteina P8, mentre all'estremità presenta 5 copie di

ognuna delle proteine P3, P7, P6 e P3 (fig.5) . La proteina P3 si lega al recettore presente all'estremità del pilo F del batterio *E.coli* [56].

Fig.5 Struttura di un batteriofago M13

Il concetto alla base dell'esposizione di proteine o peptidi esogeni sulla superficie di fagi M13 è stato inizialmente introdotto, nel 1985, da G.P. Smith [57], il quale dimostrò che i fagi esponenti un antigene potevano essere purificati mediante affinità, utilizzando uno specifico anticorpo immobilizzato. In tal modo si consentiva un arricchimento della presenza del fago con in fusione l'antigene specifico di circa 1000 volte, all'interno di un *background* di particelle fagiche che non esponevano l'Ag. L'idea di base è che un fago, codificante una specifica proteina di fusione sulla propria superficie, può essere isolato per la capacità di legame di quest'ultima, all'interno di una collezione di miliardi di fagi, con differenti proteine esposte. Uno dei grossi vantaggi di tale sistema è il accoppiamento tra il fenotipo ed il genotipo: il gene codificante per una proteina selezionata per una sua specifica proprietà, si trova all'interno della particella fagica che lo espone, permettendo, perciò, la facile identificazione della proteina coinvolta nel legame mediante sequenziamento del DNA.

La possibilità di eseguire successivi cicli di selezione permette di isolare proteine presenti in scarso numero in una popolazione di miliardi di fagi differenti (un tipico ciclo di selezione è illustrato nella figura fig.6).

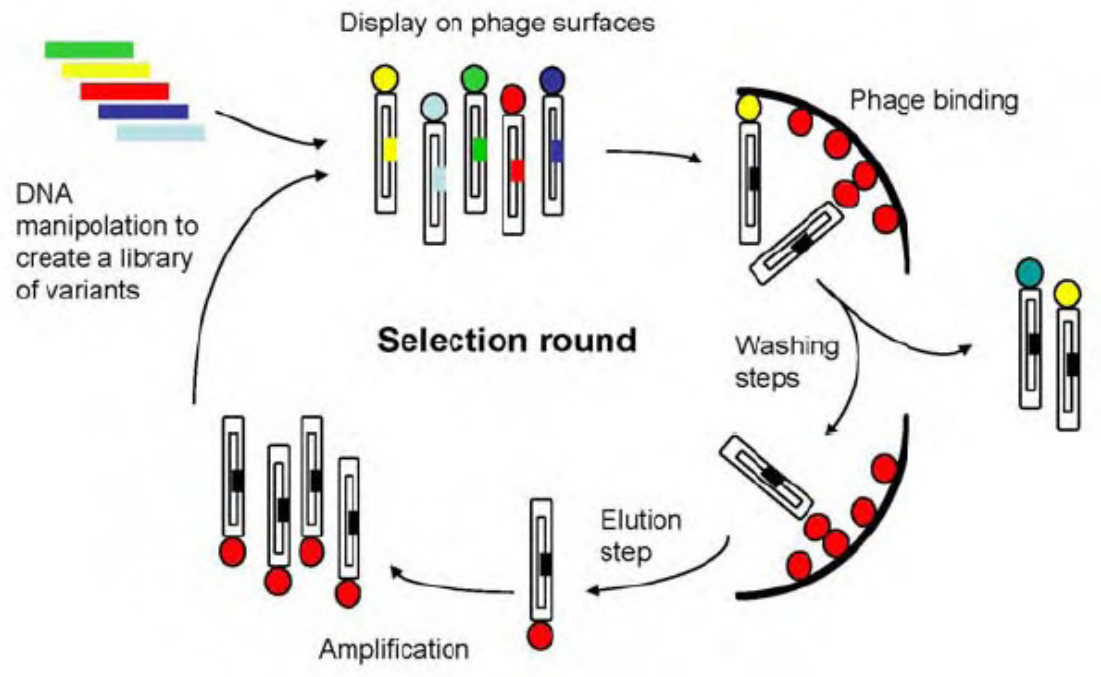

Fig.6 L'isolamento di un fago specifico, per la sua interazione con un ligando, porta all'identificazione del gene corrispondente. Possono essere eseguiti da uno a cinque cicli di selezione, permettendo l'aumento della presenza anche di fagi che sono rappresentati in numero ristretto nella libreria originaria.

Generalmente il ciclo del phage display inizia con la creazione di una certa diversità a livello del DNA. I frammenti di DNA da analizzare vengono solitamente clonati a monte del gene codificante per la proteina 3 o 8 del fago: nel primo caso, ci saranno da 3 a 5 proteine ricombinanti sul capside, nel secondo, tutte le 2700 copie della proteina capsidica saranno ricombinanti. Salvo per il *display* di corte sequenze peptidiche, il sistema che si basa sulla proteina 3 è generalmente preferito.

Vettori fagmidici sono stati sviluppati, poiché lavorare con il genoma dei fagi è piuttosto complesso. Questi vettori contengono un origine di replicazione fagica, Ff origin, ed il gene codificante per la proteina 3. Essi possono essere manipolati e propagati come normali plasmidi e, quando il *display* è richiesto, i batteri contenti i vettori vengono infettati con un fago *helper*, che procura tutti gli altri componenti necessari per la creazione di particelle fagiche ricombinanti e selezionabili.

3.2.2 Applicazioni

Un enorme numero di applicazioni sono state proposte per la tecnica del *phage diplay*:

- *phage display di peptidi naturali*, con lo scopo di mappare gli epitodi di anticorpi e di generare immunogeni [58];

- *phage display di peptidi casuali,* per identificare substrati enzimatici, o ligandi peptidici per le proteine coinvolte nelle interazioni [59];
- *phage display di proteine e di domini proteici,* per isolare anticorpi ad alta affinità [60], e *screening* di librerie di espressione di cDNA [61].

Una delle applicazioni più importanti è stata sicuramente il *phage display* anticorpale, in cui un intero repertorio degli anticorpi di un sistema immunitario può essere trasferito all'interno di questo sistema *in vitro*, ed utilizzato per selezionare anticorpi con una particolare specificità. La dimensione originaria del repertorio anticorpale può essere anche amplificata inducendo una diversità artificiale, generando nuovi anticorpi. La tecnologia del *phage display* anticorpale si è sviluppata nei primi anni 90 grazie al gruppo di Greg Winter a Cambridge [62, 63], e successivamente migliorato e modificato da diversi laboratori nel mondo. Migliaia di anticorpi monoclinali sono stati isolati con questa metodica, per scopi di ricerca e terapeutici.

Mentre il *display* di peptidi è stato largamente utilizzato, il display di cDNA, con l'eccezione degli anticorpi, ha avuto un utilizzo limitato [64, 65]. È stato anche provato il *phage display* di frammenti di DNA genomico [66].

Sebbene il concetto sia molto interessante, il *display* di librerie di cDNA sui fagi filamentosi è risultato essere difficoltoso, principalmente perché i frammenti di DNA devono essere *in frame*, ovvero devono mantenere la giusta cornice di lettura, con la proteina del capside fagico scelta per il *display*. La prevalenza di frammenti "fuori *frame*" che non vengono espressi, porta non solo all'aumento delle dimensioni della libreria, ma anche alla presenza di un forte *bias* (i fagi che non espongo peptidi esogeni crescono meglio e più rapidamente) che potrebbe complicare la selezione.

3.2.3 La selezione della *open reading frame*

L'eliminazione di sequenze *out-of-frame* è divenuto auspicabile, a volte anche indispensabile per alcune applicazioni. La preselezione di una libreria, per la rimozione di varianti delle cornice di lettura, è una tecnica efficace per ridurre la quantità della diversità molecolare da valutare nei passaggi successivi, mentre il simultaneo arricchimento di effettive sequenze proteiche rappresentate in natura, incrementa la probabilità di identificare un clone con le funzioni desiderate.

Recentemente, diversi metodi per identificare e rimuovere sequenze di DNA, che non rispettano la cornice di lettura corretta, sono stati sviluppati. Gli approcci iniziali coinvolgevano l'espressione di proteine di interesse fuse all'estremità N-terminale di una

proteina fluorescente (GFP) [67] o alla cloramfenicolo-acetil transferasi [68]. Il concetto è che se la sequenza di DNA di interesse rappresenta una *open reading frame* (ORF), questo consente la sua espressione in fusione con un gene *marker*, che ne conferisce un fenotipo rilevabile (fluorescenza o resistenza agli antibiotici).

Etz et al. [69] hanno ottenuto delle librerie da DNA genomico di *Staphylococcus aureus* e l'arricchimento della libreria per le ORF è stato ottenuto esprimendo piccoli (50-250 bp) frammenti in fusione con la beta-lattamasi, e piastrando su piastre di agar contenenti ampicillina. La libreria è stata subclonata in vettori appropriati per le successive applicazioni.

Mentre questi sistemi hanno una provata efficienza nella rimozione di frammenti che non rispettano l'ORF, hanno anche, inevitabilmente, una pressione di selezione per il *folding* e la solubilità della proteina di interesse, ed è impossibile quantificare il grado di pressione selettiva per il *folding* dato dai sistemi scelti per l'espressione. Il rischio è che varianti funzionali vengano eliminate nel corso della preselezione dei frammenti corretti. Sono stati descritti sistemi che consento la selezione di frammenti che rispettino l'ORF anche se difettano per il corretto *folding* o per la loro scarsa solubilità [70].

3.2.4 Il vettore pPAO

Il nostro gruppo si è basato sull'esperienza del Laboratorio dell'Università di Trieste del Prof. Marzari, che ha sviluppato un metodo per selezionare il DNA codificante ORF partendo dal DNA totale, nel contesto di uno specifico vettore. Clonando i frammenti di DNA a monte di un gene di fusione, costituito dal gene della beta-lattamasi affiancato dai siti di ricombinazione *lox*, a loro volta a monte del gene 3 del fago, solo i cloni contenenti delle ORF conferiscono la resistenza all'ampicillina e sopravvivono. Dopo la selezione, il gene per la beta-lattamasi può essere rimosso utilizzando la *Cre*-ricombinasi, enzima che riconosce le sequenze *lox* e, mediante ricombinazione, elimina il DNA fra essi contenuto, lasciando il vettore fagmidico con la ORF in fusione con il gene 3, senza la necessità di eventuali sub-clonaggi, come precedentemente riportato [71].

Come riportato nella figura 7, solo 1/18 dei frammenti casuali di DNA codificano effettivamente per un ORF, infatti, 1/2 dei frammenti ha l'orientamento corretto, 1/3 inizia e 1/3 termina con il corretto *frame*. Questo implica che solo il 5.5% dei fagi sono funzionali; con il sistema sviluppato, almeno l'80% dei fagi espongono correttamente polipeptidi funzionali [72].

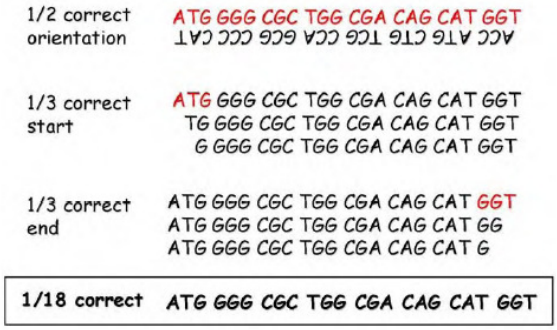

Fig. 7 Solo 1/18 dei frammenti casuali di DNA possono essere esposti effecacemente sulla superfice dei fagi, ciò è dovuto alla necessità di avere un corretto orientamento, e esatti codoni di inizio e di fine.

Oltre ai metodi generali, si è dimostrato in un recente lavoro [105] che questo approccio potrebbe essere utile per la creazione di librerie arricchite per ORF di un singolo gene, da utilizzare per la mappatura dell'epitopo di anticorpi monoclonali. In questo lavoro, 88 su 94 (93.6 %) cloni permettevano l'identificazione di frammenti di interesse. Questa metodica potrebbe essere utilizzata per qualsiasi sistema che richieda la produzione di frammenti proteici, come, per esempio, l'identificazione di nuovi interattori per una proteina di interesse.

3.3 L'utilizzo di un sistema doppio ibrido in batteri

Spesso si vuole ricercare o confermare un'interazione proteica, utilizzando dei sistemi applicabili a un contesto cellulare, capace di riproporre situazioni anche fisiologicamente simili a quelle in cui avviene il legame tra le due proteine.

Il sistema del doppio ibrido in lievito [Fields e Song 1989] si basa sul prodotto di fusione formato da due polipeptidi interagenti (ad esempio Ag-Ab, ormone-recettore, tossina-recettore, enzima-substrato…) e da due subunità funzionali di una fattore trascrizionale, generalmente composto da due domini: il primo interagente con il DNA (dominio legante), l'altro responsabile dell'attivazione della trascrizione (dominio attivante). L'interazione tra i due polipeptidi ricostituisce il fattore trascrizionale, che interagisce con il promotore permettendo la trascrizione di un gene reporter, che solitamente conferisce la resistenza ad un antibiotico o è un marcatore auxotrofico.

Il lievito è l'organismo d'elezione per il sistema di doppio ibrido, ma risulta inadatto per lo studio di un fattore trascrizionale (Foxp3), a causa della possibile attivazione spontanea dei geni reporter ad opera della proteina in fusione.

Nel sistema a doppio ibrido in batteri [101, 102], il principio è lo stesso, ovvero due domini proteici sono fusi a due potenziali interattori. Il reporter, in questo caso, è l'enzima responsabile della resistenza all'ampicillina, la beta-lattamasi. La ricostituzione funzionale dell'enzima e la conseguente crescita di colonie batteriche in presenza del marker di

selezione è indice di interazione tra i prodotti dei due gene clonati. Questo sistema è generalmente chiamato PCA (*Protein-fragment Complementation Assay*).

Il sistema in batteri si basa sulla scissione di una proteina, la β-lattamasi, la cui ricostituzione è necessaria per conferire la capacità di crescita selettiva dei batteri in un terreno in presenza di ampicillina. La β-lattamasi viene, infatti, divisa in due parti non funzionanti singolarmente, a cui vengono fuse rispettivamente due proteine di cui si vuole saggiare l'eventuale interazione. L'interazione permette l'avvicinamento delle due sub-unità della beta-lattamasi e la ricostituzione funzionale dell'enzima: ciò conferisce ai batteri la capacità di sopravvivere in presenza dell'antibiotico. Tale approccio può essere condotto non solo tra due proteine, ma esteso su larga scala andando a clonare intere librerie di peptidi o proteine

-Risultati-

[…] la modestia si addice allo scienziato, ma non alle idee che sono in lui e che egli ha il dovere di difendere.
Jacques Monod

Introduzione ai risultati

Diverse metodologie biomolecolari possono essere utilizzate al fine di ricercare nuovi potenziali interattori proteici. Questo approccio multiplo è anche consigliato per la variabilità dei campioni di partenza che vengono analizzati, che possono condurre a risultati differenti e spesso non complementari.
Il lavoro di questa Tesi è stato, pertanto, suddiviso a seconda dei diversi approcci affrontati per l'identificazione di nuove proteine potenzialmente interagenti con il fattore trascrizionale Foxp3.

Il lavoro si articola partendo dalla messa a punto delle condizioni sperimentali ottimali per la produzione, in forma ricombinante, della proteina di interesse, Foxp3.
La disponibilità della proteina purificata ha permesso, quindi, di pianificare una serie di esperimenti che vanno dalla coprecipitazione alla messa a punto di selezione di librerie fagiche, al fine di isolare nuovi anticorpi monoclonali (con l'utilizzo di librerie fagiche anticorpali) o di caratterizzare peptidi interagenti direttamente con Foxp3 (per mezzo di librerie fagiche di cDNA).

1 – Foxp3 e i domini funzionali in forma ricombinante

1.1 Strategia di amplificazione

L'analisi della sequenza amminoacidica e strutturale della proteina Foxp3 mostra la mancanza di siti sensibili per modificazioni post-trasduzionali (come glicosilazione, citrullizazione…) al suo interno. Inoltre, la struttura secondaria, non è caratterizzata da un ripiegamento (*folding*) particolare, generato ad esempio da ponti di-solfuro. Risulta essere una proteina che, nelle condizioni fisiologiche in cui normalmente si trova, non mostra una struttura particolarmente complessa. Perciò la produzione *in vitro* della proteina può essere sviluppata in un sistema procariotico, garantendo un prodotto del tutto analogo al fattore trascrizionale, presente nel nucleo delle cellule T regolatorie.

La produzione in batteri permette l'espressione della proteina di interesse in fusione con particolari sequenze polipeptidiche, che ne aumentano la solubilità e ne facilitano il corretto ripiegamento, oltre a consentirne la purificazione, mediante cromatografia di affinità. La velocità di crescita batterica permette, inoltre, di ottenere quantità discrete di proteina ricombinante in tempi brevi.

Per ottenere la sequenza dell'intero gene Foxp3, ma che anche dei suoi soli domini funzionali, sono state progettate specifiche sequenze oligonucleotidiche (*primers* – riportate in Materiali e Metodi) (Fig.1):

- gene Foxp3 intero	(a.a. 1 – 423)
- dominio N-terminale	(a.a. 1 - 113)
- dominio Zinc	(a.a. 155 - 223)
- dominio FKH	(a.a. 327 -423)

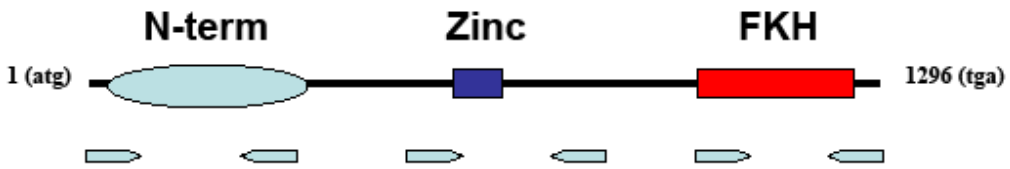

Fig.1 Rappresentazione schematica della strategia di amplificazione del gene *Foxp3* e dei suoi domini funzionali mediante disegno di specifici oligonucleotidi (vedi Materiali e Metodi).

Per l'amplificazione genica, si è utilizzato, come campione di partenza, il cDNA ottenuto dalla frazione delle cellule mononucleate del sangue contenenti anche i linfociti T,

composti sia da cellule T regolatorie (Treg) sia da T effettrici (Teff). Dopo estrazione di RNA totale, mediante retrotrascrizione con esa-nucleotidi casuali, si è sintetizzato cDNA. Da questo campione si sono poi allestite le reazioni di PCR per l'amplificazione genica.

1.2 Clonaggio nei vettori di espressione

Per il clonaggio e la messa a punto dell'espressione e purificazione della proteina in forma ricombinante è stato valutato l'utilizzo di due vettori plasmidici:

– **pTrcHisB**: consente l'espressione della proteina ricombinante in fusione, all'estremità N-terminale, con una breve sequenza amminoacidica di sei istidine, che ne permette la purificazione mediante resina Ni-NTA (*nickel-nitrilotriacetic acid*, QIAGEN);

– **pMal-c2**: consente la produzione della proteina in fusione, all'N-terminale, con la proteina MBP (*Maltose Binding Protein*), di circa 48KDa, che ne facilita il corretto *folding* e la purificazione mediante resina coniugata con amilosio.

Foxp3 ed i suoi domini funzionali sono stati, quindi, amplificati con i *primers* specifici, che aggiungono, alle estremità, siti di restrizione opportuni per il loro clonaggio: in particolare XhoI ed HindIII per il vettore pTrcHisB, EcoRI ed HindIII per il vettore pMal-c2 (vedi Materiali e Metodi).

Dopo reazione di PCR, gli amplificati, a seguito del controllo dell'esatto peso molecolare su gel di agarosio, sono stati purificati e trattati con gli opportuni enzimi di restrizione. Similmente anche i vettori di espressione sono stati sottoposti all'azione degli enzimi di restrizione e purificati. Eseguita la reazione di ligasi, si è effettuata una trasformazione di cellule DH5αF' rese chimicamente competenti. Le colonie cresciute su piastra sono state analizzate, tramite PCR, per confermare la presenza del costrutto. Inoltre, la conferma dell'identità del gene clonato è stata confermata mediante reazione di sequenziamento nucleotidico.

1.3 Prove di espressione e di purificazione di Foxp3 ricombinante

Dovendo produrre e purificare una proteina ricombinante di origine eucariotica in un sistema batterico, si è scelto di utilizzare due diversi vettori, per determinare quale fosse il sistema in grado di garantire la miglior resa.

Proteine eucariotiche nei batteri possono dar luogo a corpi di inclusione insolubili, o avere rese molto scarse che non ne consentono la purificazione. Per ottimizzare la loro produzione, si sono valutate anche differenti condizioni di temperatura e di durata della crescita dei batteri, dopo induzione alla produzione della proteina ricombinante mediante aggiunta di 0,2 mM di IPTG.

Raggiunta OD_{600} 0,5 la coltura batterica viene indotta alla produzione della proteina ricombinante con l'aggiunta di IPTG, quindi la crescita viene fatta proseguire o a 37°C o a 30°C, per una durata di 2, 4 ore o crescita O/N. L'analisi dell'estratto proteico con gel SDS-PAGE permette di visionare le condizioni per cui vi è l'incremento maggiore della concentrazione della proteina ricombinante, all'interno dell'estratto batterico totale, rispetto ai batteri non indotti.

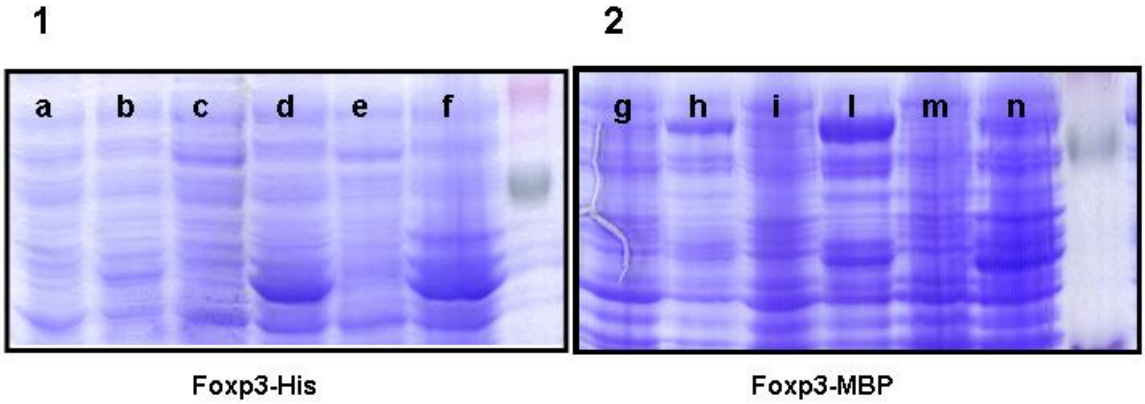

Fig.2 Prove di espressione di Foxp3 ricombinante. Nel gel 1 si osserva l'aumento di espressione di Foxp3 in fusione con le sei istidine (Fox-HIS) a seguito di induzione con IPTG dopo 2 h (b), dopo 4 h (d) e dopo crescita O/N (f), rispetto ai batteri non indotti (a, c, e). Nel gel 2 si osserva l'aumento di espressione di Foxp3 in fusione con MBP (Foxp3-MBP) a seguito di induzione con IPTG dopo 2 h (h), dopo 4 h (l) e dopo crescita O/N (n), rispetto ai batteri non indotti (g, i, m).

Alla temperatura di crescita di 30°C, con entrambi i vettori si osserva un incremento della produzione della proteina ricombinante, distinguibile dalle altre proteine batteriche (Fig. 2).

Selezionati i parametri di temperatura (30°C) ed il tempo di crescita dopo induzione (4 ore), si è effettuata nuovamente la produzione delle proteine ricombinanti in un volume di terreno di coltura maggiore (10 ml), per consentire una espressione di proteina sufficiente ad allestire delle prove di purificazione con i due sistemi selezionati. Dopo lisi batterica, la purificazione avviene mediante colonnina di affinità contenente la resina specifica per la differente proteina di fusione. A seguito dell'eluizione è stata verificata la qualità della

procedura: i risultati mostrano come la purificazione della proteina Foxp3-MBP abbia una resa migliore rispetto a quella della proteina in fusione con il tag di sei istidine (Fig.3).

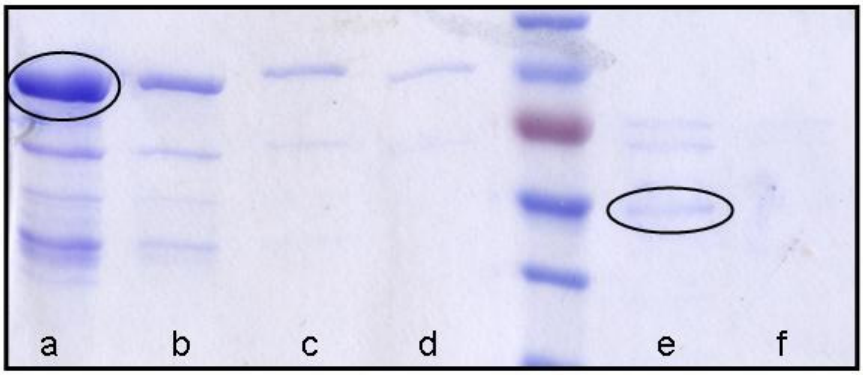

Fig.3 Prove di eluizione delle proteine ricombinanti. Nelle lanes a, b, c, d, eluizioni seriali della proteina Foxp3-MBP, chiaramente visibile nelle 4 frazioni campione. Nelle lanes e, f, eluizioni di Foxp3-6His, più scarsa e visibile solo nella prima frazione dell'eluato.

E' probabile che il ripiegamento della proteina ricombinante non consenta un'efficace esposizione delle sei istidine, e che, conseguentemente, non ne garantisca una buona resa nella purificazione.

Grazie a questi esperimenti preliminari, i batteri contenenti il vettore pMal-c2, con clonato al suo interno il gene Foxp3, sono stati fatti crescere in un volume di 400 ml. Dopo induzione la proteina è stata purificata e dializzata, e resa quindi disponibile per i successivi esperimenti.

Dati i buoni risultati ottenuti con l'espressione della proteina ricombinante utilizzando il vettore pMAL-c2, questo sistema è stato scelto anche per l'espressione e la purificazione dei domini funzionali di Foxp3.

2 – Saggi di coprecipitazione

La struttura stessa della proteina ricombinante ottenuta può essere utilizzata per la messa a punto di un saggio di co-precipitazione proteica, come tentativo per identificare nuovi interattori del fattore trascrizionale Foxp3. Sfruttando, infatti, la struttura stessa del prodotto di fusione, il fattore Foxp3 viene vincolato alla resina di amilosio grazie al suo legame con la porzione MBP della proteina ricombinante. Foxp3-MBP, così bloccato, può legare a sua volta eventuali proteine interagenti.

L'estratto proteico totale di linfociti T purificati è stato incubato O/N a 4°C con 10 µg di proteina ricombinante Foxp3-MBP o con 10 µg della sola porzione MBP, usata come controllo negativo. Tale incubazione dovrebbe consentire il legame tra Foxp3 ed i suoi interattori. I campioni vengono quindi incubati per 2 ore a RT con resina di amilosio che permette il legame per affinità della porzione MBP. La resina con vincolato Foxp3-MBP ed eventuali proteine interagenti e la resina con la sola MBP sono state confrontate grazie a colorazione con Blue-Comassie su SDS-PAGE, con cui visualizzare le proteine immobilizzate dalla resina e i potenziali interattori di Foxp3-MBP co-precipitati.

L'analisi del gel (Fig. 4) è stata effettuata mediante software QuantityOne (Biorad), che ha una miglior sensibilità nel rilevare anche bande scarsamente visibili ad occhio nudo. Il confronto è stato effettuato tra i profili dei due campioni co-precipitati, messo ulteriormente in relazione con il profilo ottenuto con l'incubazione della resina con la sola proteina Foxp3-MBP. Tale analisi non mostra nessuna differenza fra i vari campioni in esame. Ciò porta a concludere che questo tipo di procedura, così eseguita, non permette di discriminare eventuali proteine interagenti co-precipitate con Foxp3.

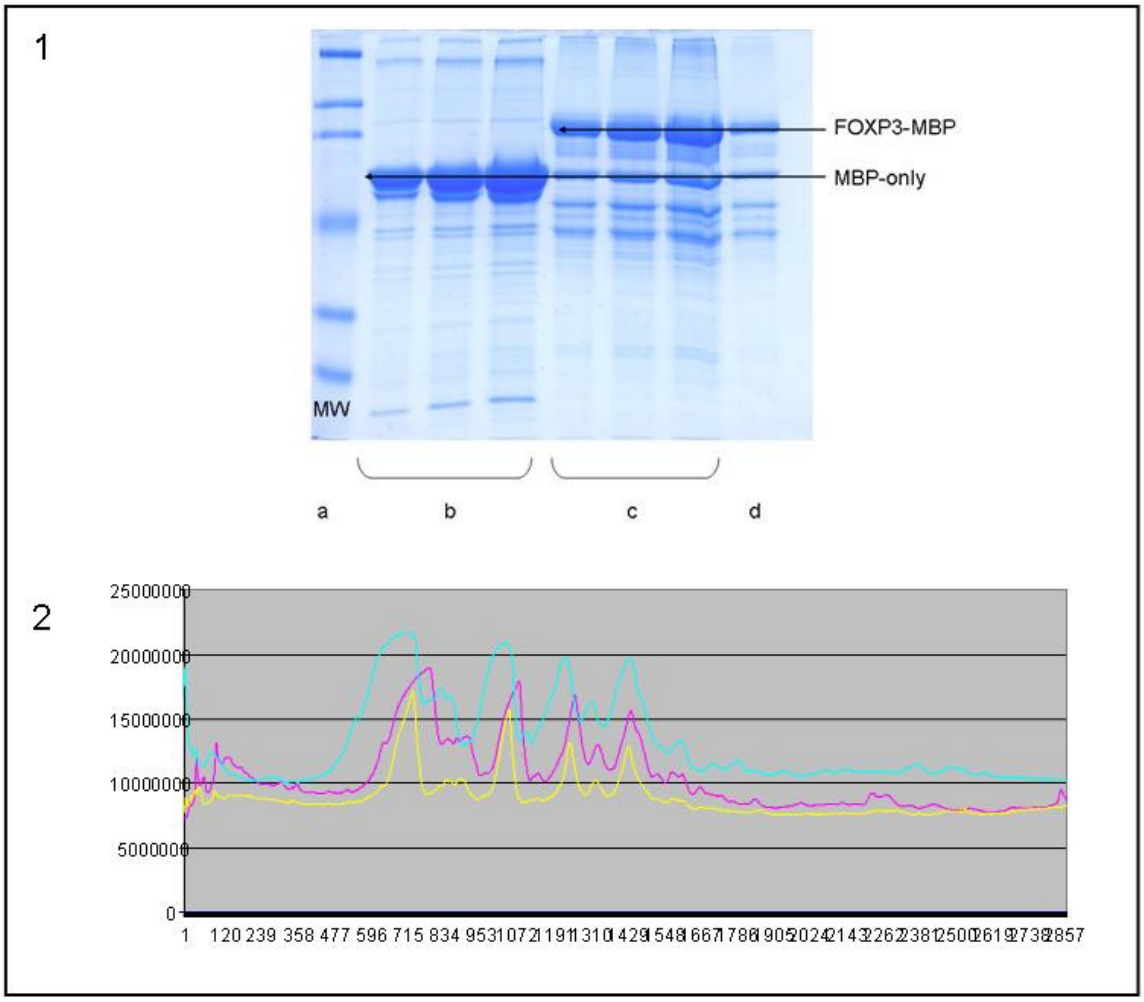

Fig. 4 Valutazione del test di coprecipitazione. In 1 viene mostrato il risultato dell' SDS-PAGE colorato con Blue-Comassie: a) pesi molecolari; b) estratto cellulare trattato con la sola proteina MBP; c) estratto cellulare incubato con la proteina Foxp3-MBP, d) resina trattata con la sola proteina Foxp3-MBP. In 2, comparazione del bandeggio proteico dei 3 campioni utilizzando software QuantityOne (Biorad). Si nota come non si si riescano ad apprezzare differenze significative delle proteine presenti nei diversi campioni (lane azzurro corrisponde ai campioni c, lane violetto ai campioni b, lane giallo al campione d)..

3 – Saggi di immunoprecipitazione

Il successivo tentativo per isolare nuovi interattori di Foxp3 è stato condotto mediante saggi di immunoprecipitazione. Per sviluppare questi esperimenti è necessario disporre di anticorpi (Ab), preferibilmente monoclonali, estremamente specifici per l'antigene in esame. Per tal motivo è essenziale identificare l'Ab capace di reagire in maniera specifica non solo con la proteina ricombinante, estremamente pura, ma anche di riconoscere l'antigene in una soluzione complessa di proteine, come appunto un intero estratto proteico cellulare.

3.1 Reattività di anticorpi commerciali anti-Foxp3

L'analisi per verificare la reattività degli anticorpi commerciali verso Foxp3 è stata eseguita mediante Western Blot. Su gel SDS-PAGE vengono separate le proteine, ottenute da estratti cellulari ricavati da linfociti T di sangue periferico, prima e dopo attivazione con PHA, che dovrebbe favorire l'espressione del fattore trascrizionale. Le proteine analizzate grazie al gel di acrilammide vengono trasferite su membrana di nitrocellulosa, a sua volta incubata con i tre diversi anticorpi monoclonali di cui si vuole saggiare l'efficacia.
In dettaglio, si è utilizzato l'anticorpo anti-Foxp3 Santa Cruz (diluizione 1:500, durata incubazione 2 ore), anti-Foxp3 R&D (diluizione 1:500, durata incubazione 3 ore) e anti-Foxp3 BioLegend (diluizione 1:1000, durata incubazione 2 ore) (Fig.5).

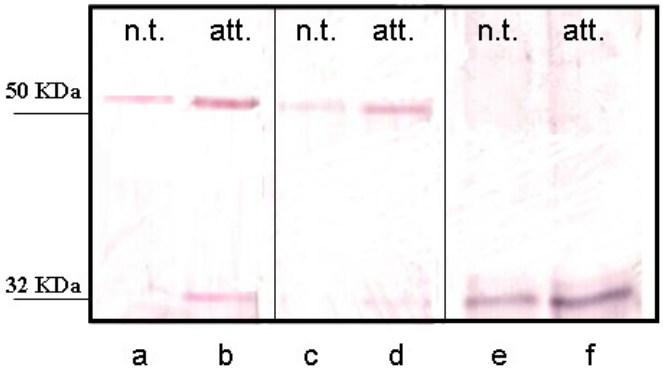

Fig.5 Analisi con WB della reattività anticorpi commerciali. Estratti proteici di cellule T non trattate (n.t.) ed attivate con PHA (att.) vengono incubati con anticorpi anti-Foxp3: R&D (a, b), Santa-Cruz (c, d) e BioLegend.

Il risultato mostra come sia l'anticorpo R&D che Santa-Cruz riconoscano una proteina di peso molecolare attorno ai 50 KDa, congruo con il peso molecolare previsto per Foxp3. Tale riconoscimento è più marcato nelle cellule attivate, dato che lo stimolo induce l'aumento di espressione della molecola. L'anticorpo BioLegend mostra una reattività

aspecifica molto marcata per una proteina di circa 32 KDa, riconosciuta in maniera minore anche dagli altri due Ab. Per i successivi esperimenti di immunoprecipitazione la scelta è stata di optare per l'anticorpo R&D.

3.2 Immunoprecipitazione

L'estratto proteico di linfociti T totali attivati è stato incubato O/N a 4°C con 10 µg di Ab commerciale anti-Foxp3 R&D. La miscela è stata quindi trattata con biglie rivestite di proteina G, capaci di legare in maniera specifica anticorpi IgG murini, quale è l'anti-Foxp3 R&D. In tal modo le biglie magnetiche legano l'anticorpo, a sua volta impegnato nel legame con l'antigene Foxp3. Tutto questo viene condotto utilizzando dei tamponi che dovrebbero garantire il mantenimento del legame tra eventuali proteine interagenti e Foxp3, a sua volta vincolato dall'Ab.

Le biglie magnetiche vengono separate dal resto della soluzione, ed il complesso immobilizzato sulla loro superficie può essere separato e visualizzato con SDS-PAGE, quindi trasferito su membrana di nitrocellulosa per eseguire un saggio di WB. Per tale saggio sono stati utilizzati due Ab monoclonali diretti contro due interattori noti di Foxp3, NFAT e NFkB [55]. Gli Ab usati sono anti-NFAT (SIGMA – diluizione 1:1000, incubazione 2 ore) ed anti-NFkB (SIGMA – diluzione 1:1000, incubazione 2 ore) .

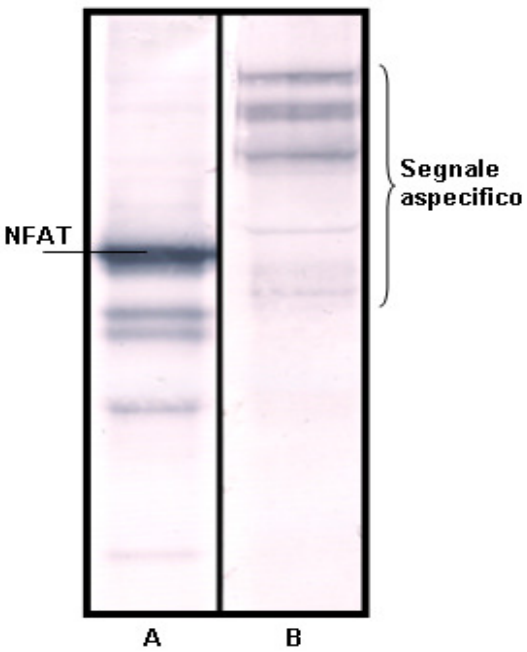

Fig. 6 Analisi WB delle immunoprecipitazioni. Lane A, incubazione con anticorpo anti-NFAT; lane B, incubazione con anticorpo anti-NFkB.

Dai risultati dell'esperimento (Fig.6) si vede come l'interazione tra Foxp3 e NFAT sia sufficientemente forte da permettere la visualizzazione di NFAT in WB, mentre per NFkB

il risultato del saggio mostra dei bandeggi aspecifici. La procedura di immunoprecipitazione adottata è capace di isolare proteine la cui interazione con Foxp3 è stata già descritta, mentre la strategia per l'analisi di altri possibili interattori è ancora da mettere a punto in maniera definitiva.

4 – Librerie anticorpali fagiche per selezionare nuovi anti-Foxp3

4.1 Caratteristiche della libreria anticorpale fagica

Disporre di nuovi anticorpi monoclonali diretti contro Foxp3 può essere utile per diversi approcci biomolecolari, tra cui migliorare i saggi di immunoprecipitazione. Una valida tecnica per la selezione di anticorpi specifici contro un determinato antigene è l'utilizzo di librerie anticorpali ricombinanti prodotte mediante *phage display*.

Data la complessa struttura degli anticorpi, in queste librerie vengono rappresentate le sole zone responsabili del riconoscimento specifico dell'antigene, costituite dai domini variabili delle catene leggere e pesanti. Queta porzione dell'Ab ottenuta in forma ricombinante prende il nome di **scFv** (*single chain fragment*).

Grazie alla collaborazione con il Prof. Sblattero, responsabile del Laboratorio di Biologia Applicata dell'Università del Piemonte Orientale a Novara, si è potuto usufruire di una libreria anticorpale derivata da 40 differenti campioni di linfociti umani purificati da sangue, con cui potenzialmente si può generare una collezione di immunoglobuline dirette contro le più disparate proteine.

In sintesi, si è generata una libreria primaria ($7x10^7$ cloni) ottenuta per amplificazione in PCR di tutte le zone variabili delle catene pesanti (7 famiglie VH) e leggere (3 famiglie Vk e 4 famiglie Vλ, complessivamente denominate VL) mediante oligonucleotidi appositamente progettati [73]. Le due sequenze geniche, VH e VL, ottenute separatamente, vengono quindi unite da una sequenza specifica definita *linker* andando a formare l'*assembling*, che porta alla formazione del scFv definitivo. Tali costrutti vengono clonati nel vettore fagico pDAN5 e trasformati per elettroporazione in batteri.

Al fine di aumentare la diversità, ciascuno dei due domini variabili dello stesso scFv è fiancheggiato da un sito lox non omologo: siti lox omologhi su scFv diversi possono ricombinare attraverso l'azione specifica della recombinasi *Cre*, portando così alla formazione di nuovi scFv.

Grazie alla possibilità di riprodurre l'intera libreria in forma di particelle fagiche, è possibile trasformare batteri del ceppo *E.coli* BS1365, che esprimono in maniera costitutiva l'enzima *Cre*-ricombinasi (Fig. 7). Al seguito della ricombinazione è stata ottenuta una libreria finale di 10^{11} singoli cloni, costituita, pertanto, da una complessità anticorpale di gran lunga superiore a quella del sistema immunitario umano [74].

Questa libreria è stata pertanto utilizzata per selezionare e caratterizzare scFvs specifici per Foxp3.

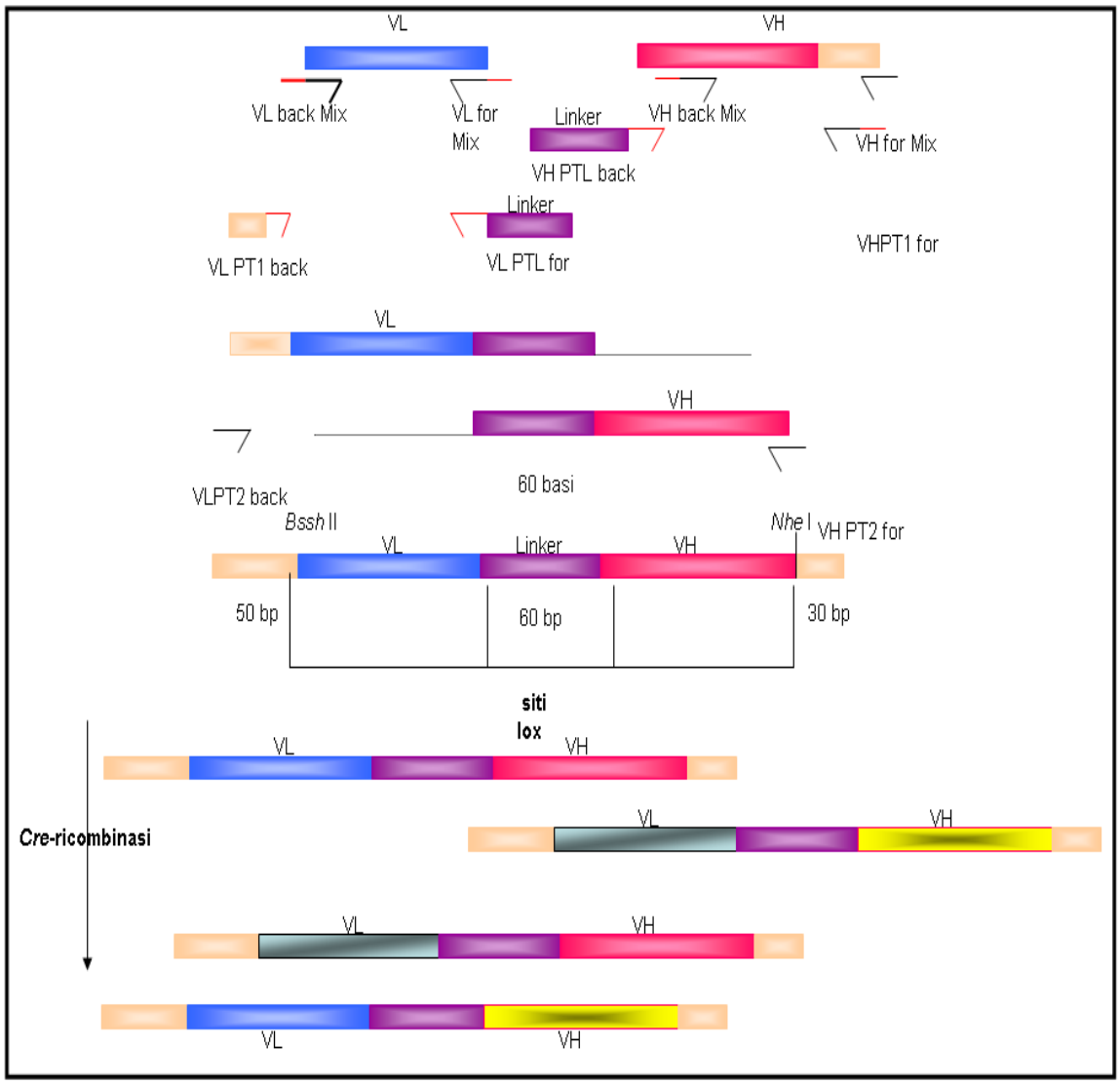

Fig.7 Creazione di scFvs e riarrangiamento mediante siti *lox* e *Cre*-ricombinasi per aumentarne la diversità.

4.2 Selezione di anticorpi fagici Foxp3 specifici

La libreria finale è stata espressa in forma di fagi, la cui singola particella espone sulla propria superficie un diverso scFv. Effettuati due cicli di selezione, si è proseguito con lo *screening* della libreria fagica per identificare i cloni specifici più immunoreattivi verso Foxp3. Questo è stato condotto mediante ELISA, sia sulla proteina ricombinante Foxp3 in fusione con MBP, che sulla sola proteina MBP, per identificare i cloni interagenti esclusivamente con il fattore trascrizionale e non con la proteina di fusione ad esso associata.

Sono stati analizzati circa 200 cloni e sono stati selezionati quelli con la miglior risposta contro Foxp3 (in rapporto alla risposta contro il solo MBP di controllo) (Fig.8). La diversità dei 21 cloni selezionati è stata valutata mediante fingerprinting.

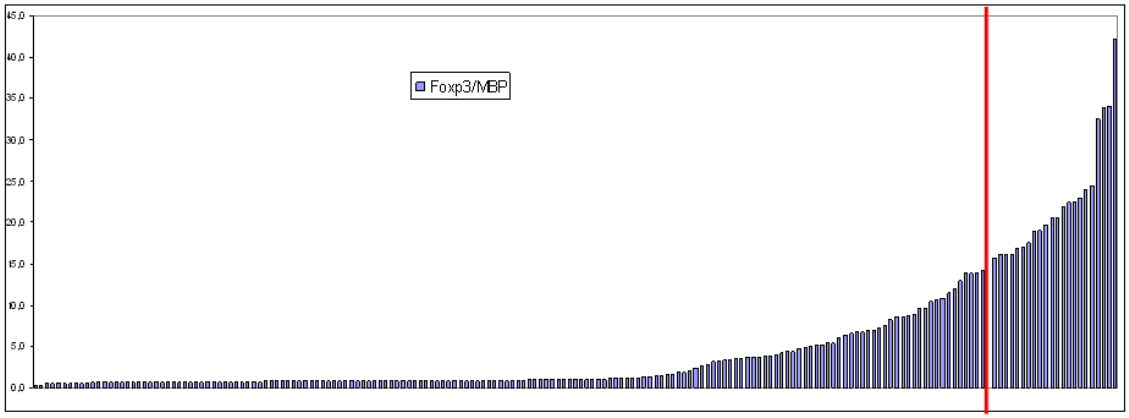

Fig.8 Risultati del phage-ELISA con scFv anti-Foxp3. Sono riportati i rapporti della reattività verso Foxp3 e MBP di 200 scFvs casuali, ottenuti dopo due cicli di selezione. Arbitrariamente, sono stati scelti i cloni con rapporto superiore a 15 per le successive analisi.

Gli stessi scFvs, prodotti in forma solubile, sono stati nuovamente analizzati mediante ELISA, al fine di verificare quali di essi venissero prodotti efficacemente come proteina ricombinante. La reattività contro l'antigene è stata valutata sia in condizioni fisiologiche (diluendo l'antigene in PBS) che denaturanti (antigene diluito in tampone urea 4 M), per rilevare quali fossero i scFv capaci di riconoscere non solo la forma conformazionale della proteina.

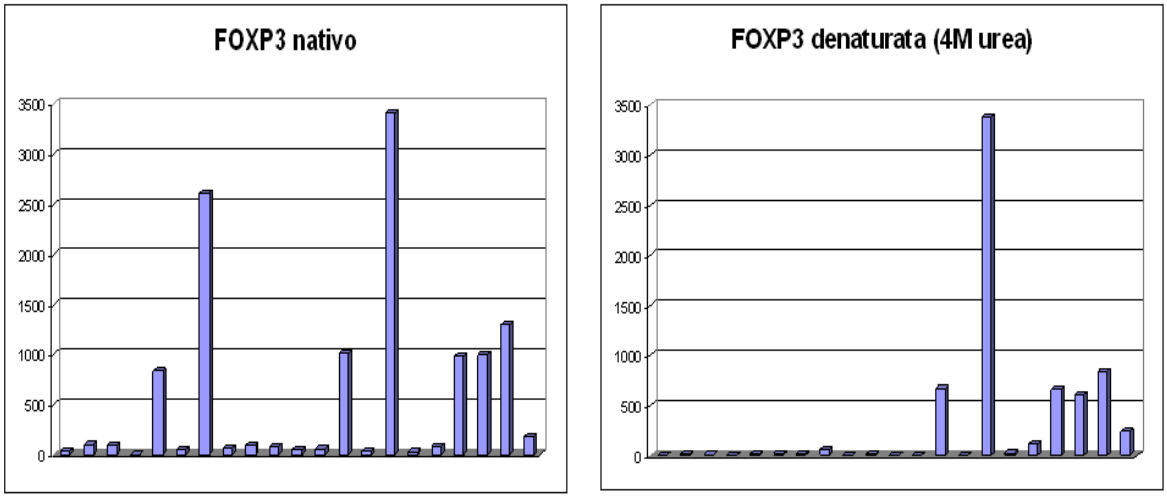

Fig. 9 Reattività dei scFvs prodotti in forma solubile verso l'antigene in forma nativa e denaturata.

Il clone λG6 ha dimostrato un'elevata reattività anche nella forma solubile, reattività che permane anche contro la forma denaturata della proteina (Fig.9): questo è stato conseguentemente scelto per i successivi saggi sperimentali. Tale scFv è stato caratterizzato mediante sequenziamento genico: risulta composto da una catena VH appartenente alla famiglia genica VH3/DP77 e da una catena VL derivante da Vλ1/DP08. La regione codificante di tale scFv è stata clonata nel vettore pcDNA3.1-Hygro modificato, che ne permette la produzione in fusione con il dominio Fc-murino –CH2–CH3. Il costrutto risultante, denominato Minibody (MB)[75] è stato trasfettato nella linea cellulare HEK293T, al fine di ottenere cloni capaci di produrre in maniera stabile il MB in forma dimerica. La reattività e la specificità del scFv originario per il proprio antigene è stata confermata con il MB purificato dal surnatante delle colture cellulari mediante saggi ELISA e WB.

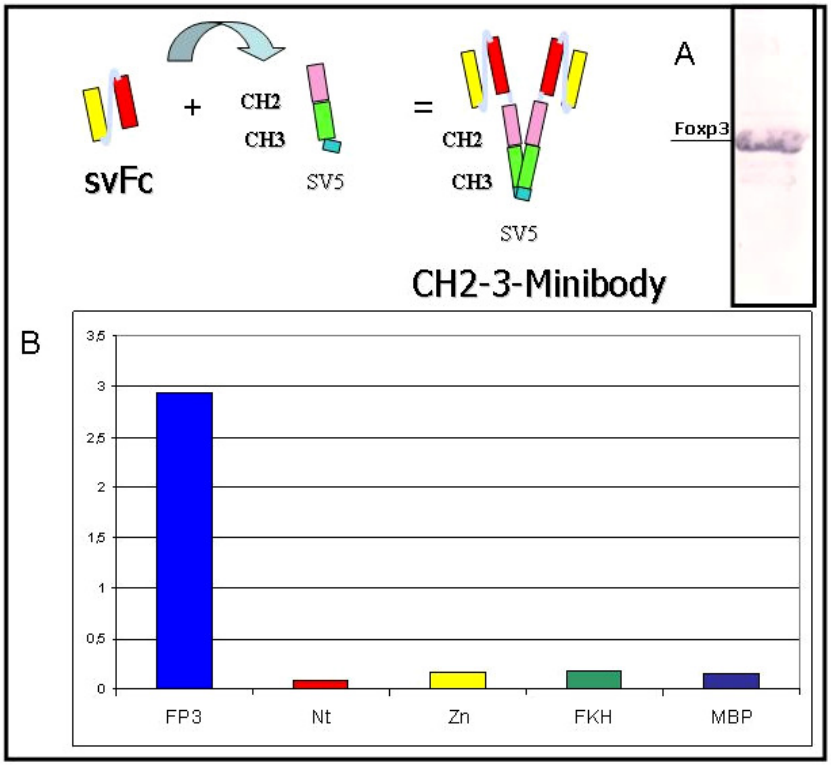

Fig. 10 Creazione di anticorpo in forma di Minibody partendo dal scFv selezionato contro Foxp3. Il minibody ottenuto risulta funzionale in saggi di WB (A) e in saggi ELISA (B) dove però riconosce solo la forma intera della proteina.

L'analisi funzionale rivela un ottimo riconoscimento, in WB, di Foxp3 da parte del scFV, oltre a mantenere una spiccata reattività in ELISA. Il saggio, condotto anche sui domini funzionali separati, mostra, invece, una specificità del riconoscimento che permane solo per la forma completa della proteina (Fig.10).

Utilizzando l'anticorpo così ottenuto in nuovi saggi di immunoprecipitazione, il risultato dell'esperimento non differisce molto da quello ottenuto nei saggi condotti con gli anticorpi commerciali, portando all'identificazione inequivocabile del solo NFAT come interattore. L'anticorpo anti-Foxp3, così ottenuto, risulta, pertanto, essere una valida alternativa, agli anticorpi attualmente presenti sul commercio, per esperimenti in cui è richiesta una spiccata specificità di legame tra antigene ed anticorpo, come appunto le immunoprecipitazioni.

5 - Selezione di librerie di frammenti di cDNA per la ricerca di nuovi interattori di Foxp3 mediante *phage display*

5.1 Costruzione della libreria fagica

Ottenere una libreria di cDNA, rappresentativa del trascrittoma di un determinato tessuto, è un procedimento estremamente laborioso. Per la ricerca di interattori è sicuramente preferibile lavorare con materiale derivante dal tessuto, o dalle cellule, in cui la proteina di interesse è prodotta in maniera specifica.

Librerie di frammenti di cDNA casuali non tessuto-specifiche possono essere, però, utilizzate qualora si voglia tentare di isolare frammenti di peptidi rappresentanti eventuali domini funzionali (spesso presenti in diverse proteine di diverse cellule o tessuti) che possono interagire con la proteina di interesse.

In collaborazione con il Laboratorio del Prof. Marzari del Dipartimento di Biologia dell'Università di Trieste, si è utilizzata una libreria di cDNA, non Treg specifica, ma derivante da cellule beta del pancreas, da carcinoma del colon e da fibroblasti epatici, per ricercare domini proteici strutturali interagenti con Foxp3.

In breve l'mRNA è stato estratto ed il cDNA preparato secondo tecniche standard. Al fine di ottenere frammenti di cDNA variabili tra le 200 e le 800 pb, sono state utilizzate opportune regolazioni di temperatura della reazione di sintesi di cDNA e opportune concentrazioni dei *random primers*. I frammenti di cDNA purificati sono strati propriamente normalizzati, in modo da equilibrare la quantità dei differenti transcritti nel campione [76]: tale operazione risulta importante per equilibrare la concentrazione dei transcritti più abbondanti al livello di quelli meno frequenti, che rischierebbero altrimenti di essere sottorappresentati nella libreria finale. Dopo la normalizzazione, ai frammenti sono stati aggiunti adattatori che ne permettessero il clonaggio orientato BssHII-NheI all'interno del vettore pPAO (descritto in 3.2.4).

Sono state generate due librerie separate, la prima ottenuta dal cDNA delle cellule beta del pancreas, la seconda rappresentante il cDNA delle cellule di carcinoma del colon (HCC) e dei fibroblasti epatici (LF).

Il vettore ed i frammenti, opportunamente trattati con gli enzimi di restrizione, sono stati sottoposti a reazione di ligasi enzimatica. La miscela della reazione è stata purificata, risospesa in acqua ed elettroporata in cellule elettro-competenti *E.coli* DH5αF'. Le librerie sono state seminate in presenza di cloramfenicolo (Chl) o di ampicillina (Amp): la

selezione con Chl (34µg/mL) permette la crescita della libreria totale, mentre la selezione con Amp (20 µg/mL) permette la crescita dei soli cloni che preservano la corretta cornice di letture (ORF). Per valutare correttamente il rapporto tra i cloni totali e i cloni ORF sono state messe in coltura anche delle diluizioni dei batteri trasformati. Dopo 15 ore di crescita a 28°C le librerie sono state raccolte, aggiunto 20% di glicerolo, e conservate a -80°C.
Nella tabella 1 sono riportate la diversità iniziale delle due librerie ed il rapporto tra cloni totali e cloni selezionati per la giusta cornice di lettura.

	HCC + LF	**Cellule-β**
Numero totale cloni trasformati (CHL)	**$9x10^6$**	**$2.1x10^7$**
Cloni selezionati per ORF (AMP-20)	**$4x10^5$**	**$1.2x10^6$**
Rapporto (teorico = 18)	**22.5**	**17.5**

Tab.1 Dimensioni delle librerie ottenute con il vettore pPAO. I cloni ottenuti su piastre contenenti cloramfenicolo (senza la pressione selettiva delle ORF) sono comparati con quelli cresciuti su piastre di ampicillina (20 µg/ml). Il rapporto è riportato e comparato con quello teorico (=18).

Il rapporto cloni totali/ORF nelle due librerie è simile al rapporto teorico atteso (1:18), suggerendo una efficace selezione delle ORF, con una buona probabilità di avere frammenti rappresentativi dei diversi geni. La dimensione media dei frammenti clonati è stata verificata mediante PCR con *primers* esterni al sito di clonaggio (riportati in Materiali e Metodi), eseguita su cloni selezionati casualmente.
La selezione effettiva delle sole ORF è stata verificata mediante la crescita e l'espressione delle proteine prodotte dopo induzione di 20 e 16 cloni rispettivamente della libreria cellule-β e HCC+LF. Il lisato batterico e una piccola quantità di estratto periplasmico sono stati trasferiti su membrane di nitrocellulosa: queste sono state incubate con il mAb anti-SV5, specifico per il tag SV5 [77], collocato tra il polipeptide esogeno e la beta-lattamasi. Solo le ORF permettono la corretta espressione al C-terminale del tag SV5; in questo caso si è dimostrato l'effettiva selezione (più dell'80%) di cloni ORF (Fig.11).

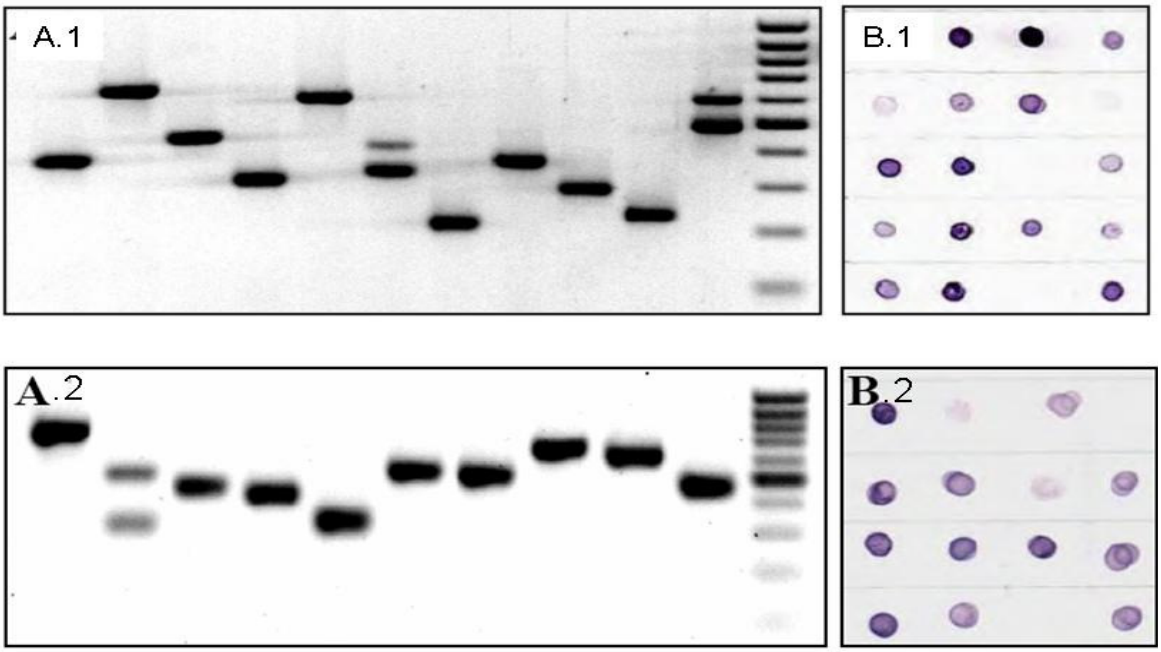

Fig. 11 Controllo della dimensione dei frammenti di cDNA dei cloni selezionati su piastre ampicillina per 20 cloni derivanti dalla libreria di cellule-β (A.1) e per la loro effettiva selezione delle ORF (B.1). Procedimento analogo è stato attuato per 16 cloni della libreria HCC+LF (A.2 e B.2).

Per evitare che la β-lattamasi in fusione con il polipeptide esogeno e la proteina III del capside fagico possa interferire con la corretta esposizione sulla superficie del fago o con la sua funzionalità, si è proceduto alla rimozione del gene della β-lattamasi grazie alla presenza, alle sue estremità, dei siti *lox*.

Tale processo è stato realizzato trasformando la libreria in un ceppo batterico che esprime costitutivamente la recombinasi *Cre* (ceppo *E.coli* BS1365). Tale enzima riconosce specificamente i due siti lox omologhi che fiancheggiano il gene della β-lattamasi: attraverso la loro ricombinazione, il gene viene rimosso e, nel costrutto finale, il cDNA si trova espresso in fusione con il gene della proteina 3 del capside. Le librerie trasformate nel ceppo BS1365 sono state messe a crescere su piastra e raccolte. L'efficacia della ricombinazione è stata verificata utilizzando *primers* esterni al gene della β-lattamasi e nel 100% dei cloni testati è stata confermata la ricombinazione (Fig.12).

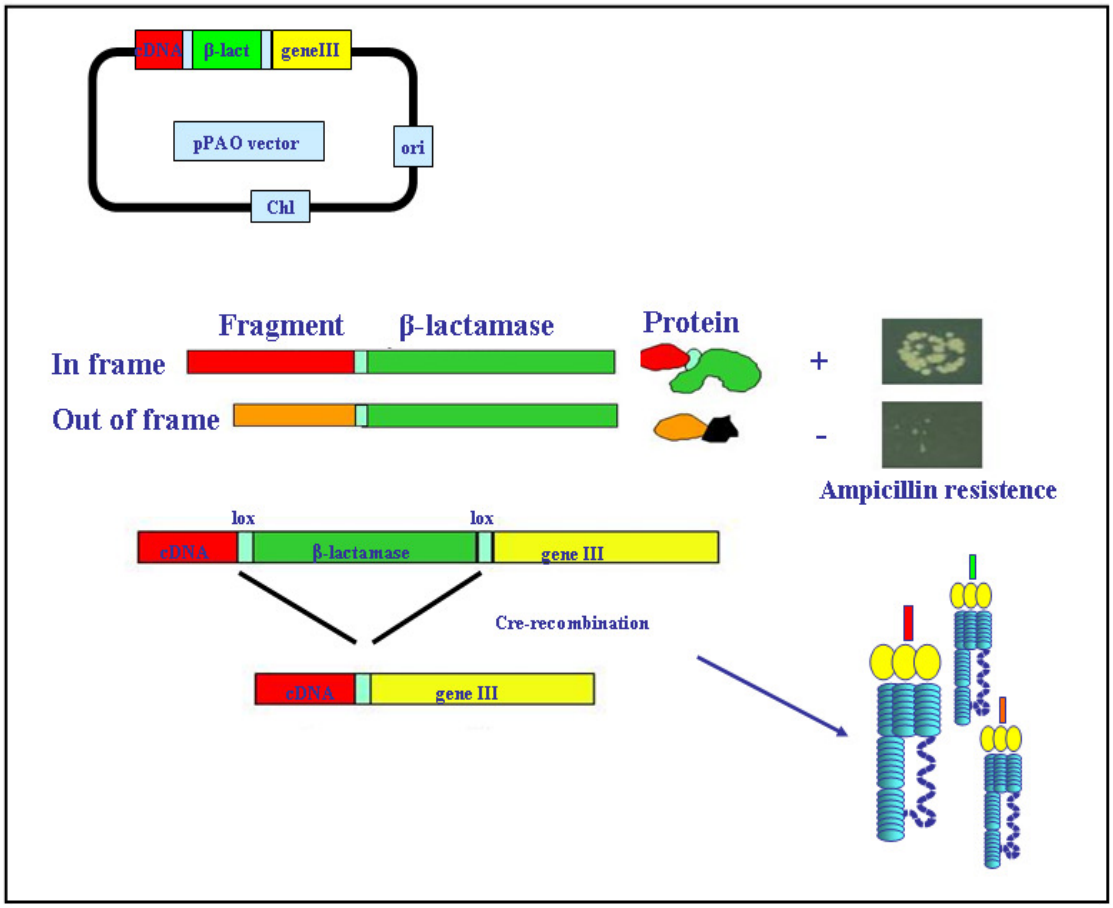

Fig.12 Rappresentazione schematica del procedimento dei cloni con una corretta cornice di lettura (ORF).

Al fine di aumentare la diversità della libreria fagica, è stato preparato uno stock comprendente sia la libreria filtrata per le ORF e ricombinata derivante dalle cellule β che quella derivante da HCC+LF: la diversità finale è stata stimata attorno a $2x10^6$. La libreria così ottenuta è stata utilizzata nei successivi esperimenti.

5.2 Strategia di selezione

Per rintracciare potenziali peptidi interagenti con Foxp3, la strategia di selezione ha previsto, per ogni ciclo di selezione, due passaggi: una selezione **negativa** ed una **positiva**. La selezione negativa permette di eliminare gli eventuali fagi che reagiscono non con la proteina di interesse (Foxp3-MBP), ma con la sola proteina MBP. A seguito di questo primo passaggio, i fagi sono stati sottoposti al normale protocollo di selezione [72], definita positiva.

Con il terzo ed ultimo ciclo di selezione si è determinata l'efficacia della strategia scelta, valutando, nella selezione positiva, il rapporto tra il numero di cloni interagenti con MBP e quelli con l'intera proteina Foxp3-MBP.

Cloni interagenti con MBP	**$5x10^4$**
Cloni interagenti con Foxp3	**$3x10^5$**
% cloni Foxp3 specifici	**84%**

Tab.2 Valutazione dei cloni specifici per Foxp3 dopo il terzo ciclo di selezione. Si è valutato il rapporto dell'output tra cloni non specifici (MBP) e cloni reattivi contro il costrutto Foxp3-MBP.

Il rapporto è significativamente a favore della proteina intera (84% dei cloni sono Foxp3-specifici) (Tab.2). L'analisi si è quindi focalizzata su singoli cloni di cui valutare la reattività verso Foxp3. Mediante *phage*-ELISA 96 cloni singoli sono stati analizzati per la loro reattività sia verso Foxp3-MBP che verso la sola proteina MBP. Scartando dalle successive analisi cloni reattivi per entrambe le proteine, si sono individuati 25 cloni reattivi in maniera specifica verso il solo Foxp3. L'identità dei peptidi interagenti è stata rilevata mediante sequenziamento. Dei 25 cloni risultanti ben 24 cloni codificano per lo stesso gene:

Sequenza proteica interattore 1 (a singola lettera corrisponde singolo amminoacido)

S N P D P G A Q Q G I S S E G D A D P Y G G L D L E E F S R Y L Q E R E Q R L L L M F H S L D R N Q D G H I D V S E I Q Q S F R A L G I S I S L E Q A E K I L H S M D R D G T M T I D W Q E W R D A A S G K P I

Sequenza proteica interattore 2

G V P D V G H F R T F P G I P K W R K T H L T Y R I V N Y T P D L P K D A V D S A V E K A L K V W E E V T P L T F S R L Y E G E A D I M I S F A V R E H G D F Y P F D G P G N V L A H A Y A P G P G I N G D A H F D D G R

5.3 Analisi informatica delle sequenze

Mediante database informatici disponibili *online* (*BLAST*) sono state analizzate le sequenze per individuare le eventuali proteine contenenti tali stringhe amminoacidiche:

Sequenza n. 1 **Ref |NP 077008.2| solute carrier family 25, member 23 [Homo sapiens]**
Emb |CAD55563.1| putative calcium binding transporter [Homo sapiens]

Sequenza n. 2 **Ref |NP 002413.1| matrix metalloproteinase 3 preproprotein [Homo sapiens]**

Le identità delle proteine ottenute non suggeriscono un coinvolgimento nella trasduzione del segnale delle cellule T o non sono specifici marker di attività linfocitaria, per cui, invece di considerare le proteine intere, si è spostata l'indagine sulla somiglianza delle sequenze selezionate con i domini funzionali in esse presenti (Fig.13).

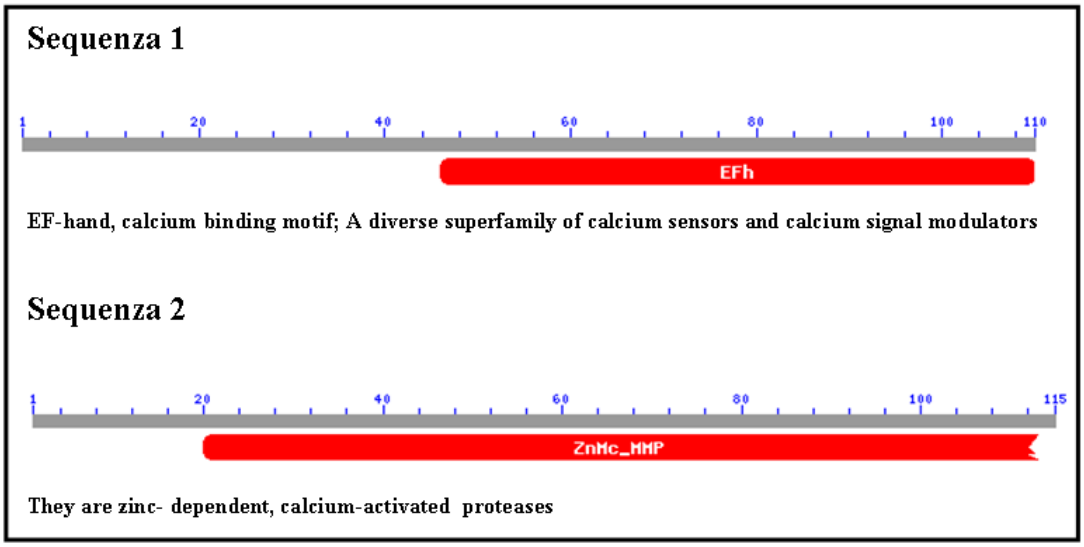

Fig. 13 Rappresentazione dei domini funzionali contenuti nelle sequenze degli interattori isolati.

Il dominio funzionale, rappresentato dalla sequenza maggiormente presente nella selezione, risulta essere affine ad un motivo strutturale calcio legante (EFH). Questa particolare zona proteica risulta compresa nella sequenza di diverse proteine, molte delle quali appartenenti alla stessa famiglia, che ricoprono dei ruoli molto differenziati all'interno delle cellule.

La seconda sequenza è analoga ad una metallo proteasi zinco-dipendente, la cui attivazione dipende dal calcio, ed è un dominio poco rappresentato.

Vista la predominanza di cloni codificanti per il dominio EFH, l'analisi si è focalizzata su questa struttura. Sono state individuate tutte le proteine contenenti il dominio EFH, con particolare attenzione nei confronti delle proteine implicate nei meccanismi immuni o nello sviluppo ed attivazione dei linfociti.

Grazie all'utilizzo del software *Prosite*, il dominio EFH viene rilevato in numerose proteine, in cui risulta essere ripetuto anche diverse volte nella struttura (Tab.3).

Nome proteina	Nr domini EFH
α actinin	2
Calbindin	4
Calcineurin B subunit (protein phosphatase 2B regulatory subunit)	4
Calcyphosin (thyroid protein p24)	4
Calmodulin	4
Calpain small and large chains	2
Calretinin	6
Calcyclin (prolactin receptor associated protein)	2
Caltractin (centrin)	2 o 4
Diacylglycerol kinase (DGK)	2
FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase from mammals	1
Fimbrin (plastin)	2
Guanylate cyclase activating protein (GCAP)	3
Inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes γ-1 and delta-1	2
Intestinal calcium-binding protein (ICaBPs)	2
MIF related proteins 8 (MRP-8 or CFAG) and 14 (MRP-14)	2
Myosin regulatory light chains	1
Oncomodulin	2
Osteonectin (basement membrane protein BM-40) (SPARC) and proteins that contains an 'osteonectin' domain (QR1, matrix glycoprotein SC1)	1
Parvalbumins α and β	2
Placental calcium-binding protein (18a2) (nerve growth factor induced protein 42a) (p9k)	2
Recoverins (visinin, hippocalcin, neurocalcin, S-modulin)	2 o 3
Reticulocalbin	4
S-100 protein, α and β chains	2
Sarcoplasmic calcium-binding protein (SCPs)	2 o 3
Sea urchin proteins Spec 1, Spec 2, Lps-1	2 / 4? / 8
Spectrin α chain	2
Troponins C; from skeletal muscle (Ca=4), from cardiac muscle	3

Tab.3 Proteine di interesse con al loro interno il dominio calcio legante EFH.

In questa lista, l'attenzione è ricaduta sulla calcineurina B ed, in particolare, sulla sua subunità regolatoria, capace di interagire con NFAT [78] nell'attivazione dei linfociti.
A ulteriore conferma, è stato utilizzato un software che permette di analizzare le diverse interazioni delle proteine, *Proscan*. Centrando l'analisi sulla calcineurina B, questa evidenzia un forte legame di interazione con la proteina NFAT(c2), la quale interagisce fisicamente con Foxp3 (Fig.14).

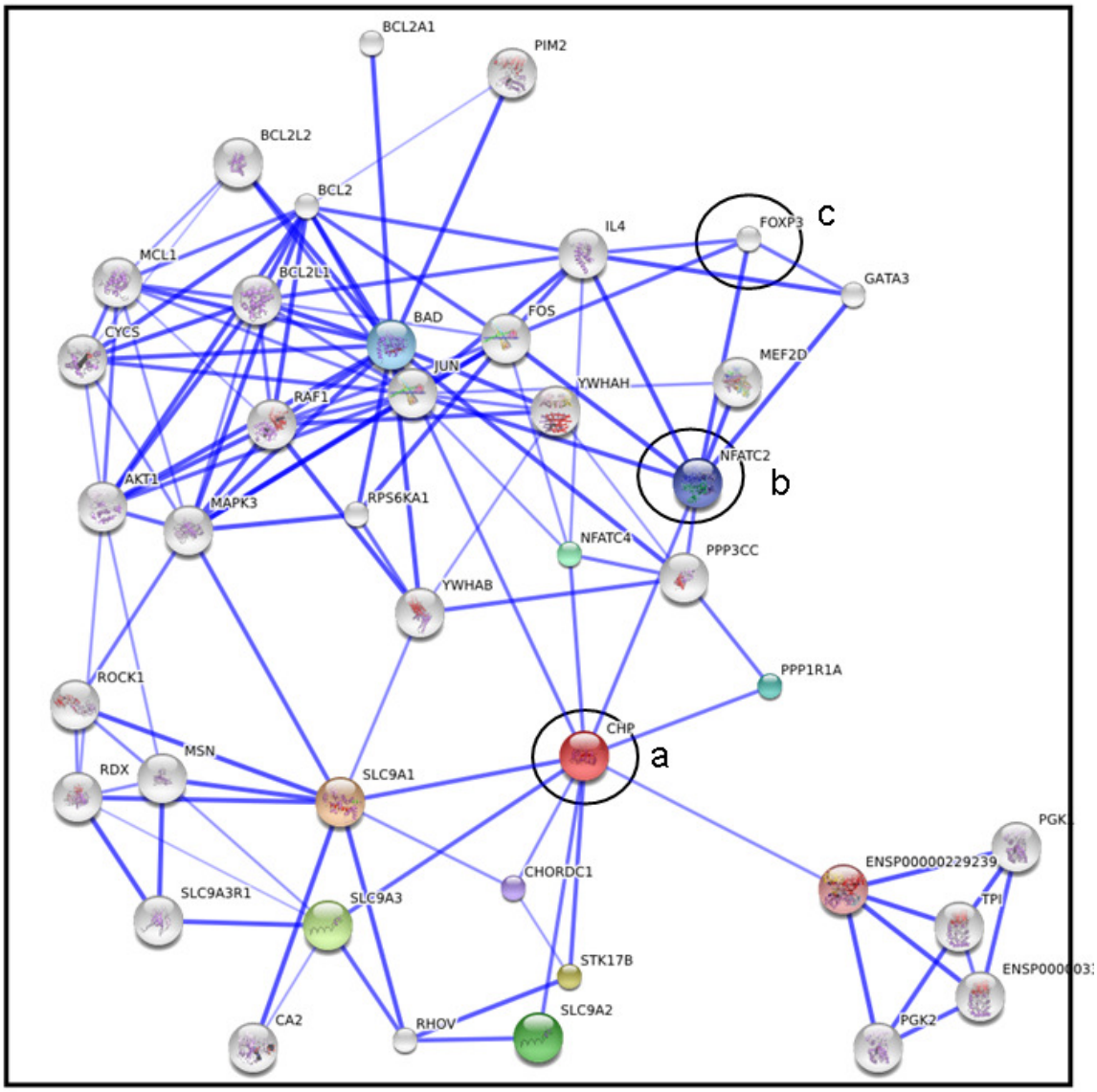

Fig. 14 Network di interazioni molecolari tra calcineurina B (a), NFATc2 (b) e Foxp3 (c).

5.4 Verifica delle interazioni mediante saggio *in vitro*

Per meglio comprendere l'interazione tra Foxp3 ed il dominio isolato, si è condotto un nuovo esperimento di *phage-ELISA*, in cui la reattività delle due sequenze peptidiche

selezionate è stata valutata non solo per l'intera proteina Foxp3, ma anche per alcuni dei suoi domini funzionali, di cui si è prodotta la forma ricombinante; in modo da identificare anche la zona della proteina coinvolta nell'interazione.

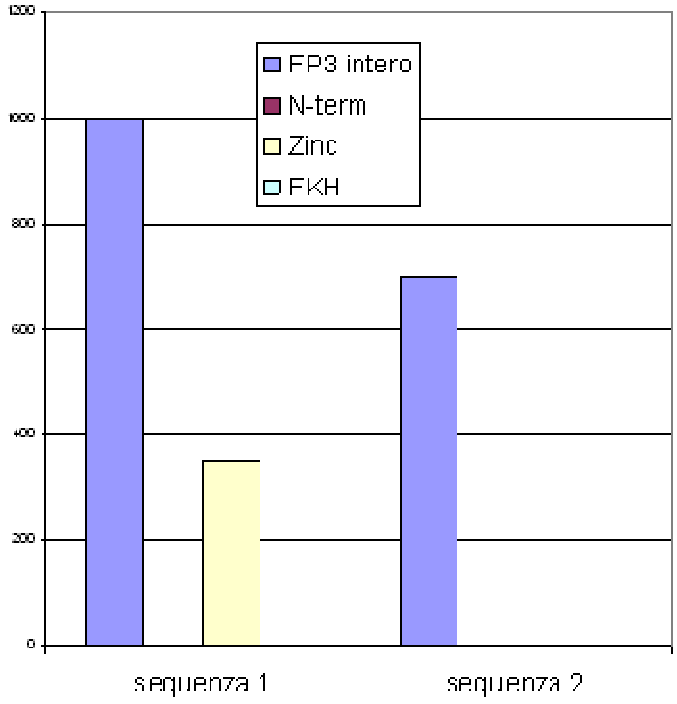

Fig. 15 Rappresentazione grafica dell'interazione tra i peptidi isolati e Foxp3 intero, il dominio funzionale N-terminale (N-term), il dominio Zinc-finger (Zinc) ed il dominio Forkhead (FKH). Per la sequenza 1 l'interazione è ristretta al dominio Zinc, mentre per la sequenza 2 l'interazione è visibile solo verso l'intero costrutto.

I risultati mostrano che la sequenza codificante per EFH interagisce col dominio Zinc, mentre l'altra sequenza mostra reattività solo nei confronti della proteina intera (Fig.15).

Le ulteriori analisi *in vitro* per convalidare il risultato sono state condotte sul solo dominio EFH vista la sua presenza predominante nella selezione.

Tale dominio è stato prodotto in forma ricombinante: il suo cDNA è stato subclonato dal vettore fagico nel vettore di espressione pGEX-mcs, il cui sito di restrizione è stato appositamente modificato per il clonaggio con siti di restrizione BssHII/NheI.

La proteina ricombinante espressa risulta in fusione con la glutatione-S-transferasi (GST), che ne permette la rapida purificazione.

Le prove di interazione sono state quindi condotte mediante *dot-blot* e saggio ELISA, analogamente a quanto fatto precedentemente (capitolo 4). La proteina ricombinante EFH viene immobilizzata o su membrana di nitrocellulosa o su materiale plastico. Dopo incubazione con la proteina Foxp3 (O/N a 4°C per il dot blot e 3 ore di incubazione a RT per il saggio ELISA), si è condotta l'incubazione con anticorpo anti-Foxp3 e quindi con un anticorpo secondario coniugato (Fig.16).

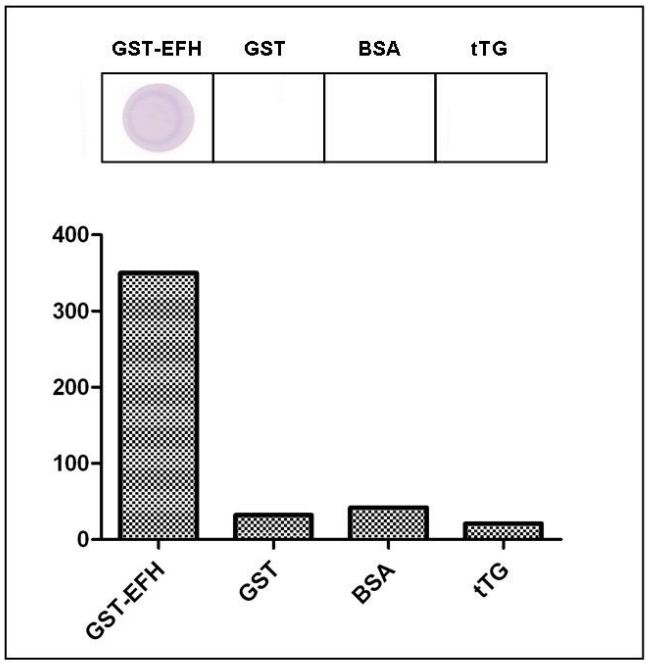

Fig.16 Saggio di interazione mediante dot blot e ELISA. La positività, visualizzata come uno spot colorato in dot-blot, viene quantificata con il saggio ELISA.

Tale tipo di verifica conferma, attraverso altri approcci, l'interazione tra Foxp3 e la peculiare struttura amminoacidica isolata grazie al *phage display*.

5.5 Verifica di interazione mediante doppio ibrido batterico

Come primo approccio per verificare l'interazione *in vivo* sia del scFv λG6 che dell'interattore EFH selezionati, è stato utilizzato un sistema di doppio ibrido in batteri (descritto in 3.3).

Il gene codificante per Foxp3 è stato clonato all'interno del vettore pAlfa, in modo da rendere il prodotto di espressione in fusione con la subunità alfa dell'enzima beta lattamasi. Nel vettore pOmega, codificante per la subunità omega, è stato clonato, in un caso, l'anticorpo specifico per Foxp3 selezionato da libreria fagica anticorpale e, nell'altro caso, il clone interagente selezionato dalla libreria di cDNA.

Inizialmente i batteri sono stati trasformati con il solo vettore pOmega. Confermata la trasformazione, per controllo della crescita delle colonie su terreno selettivo contenente cloramfenicolo (per il quale pOmega porta la resistenza) e per PCR, tali batteri sono stati resi competenti, per la trasformazione del vettore pAlfa.

La doppia trasformazione viene validata grazie alla crescita delle colonie su terreno contenente sia cloramfenicolo (resistenza di pOmega) che kanamicina (resistenza di pAlfa).

Le prove di interazione prevedono la crescita di un singolo clone doppio-trasformato in terreno con doppia resistenza (Chl-Kan). Al raggiungimento di OD_{600} 0,5, diluizioni seriali di batteri vengono piastrate, come singole gocce di 10 µl, su piastre di coltura contenenti ampicillina alla concentrazione di 20, 30 e 50 µg / ml.
Il tasso di sopravvivenza che si ottiene permette di valutare l'entità dell'interazione. Maggiore è il tasso di sopravvivenza alle concentrazioni più elevate di antibiotico, più forte sarà l'interazione tra le due proteine.

	scFv	**interattore**
Amp 20		
Tasso di sopravvivenza	40%	2,8%
Amp30		
Tasso di sopravvivenza	26,6%	1,9%
Amp 50		
Tasso di sopravvivenza	3,58%	0%

Tab. 4 Risultati del saggio di interazione effettuato mediante doppio ibrido batterico.

I risultati (Tab. 4) mostrano come effettivamente sia stata confermata l'interazione antigene-anticorpo anche in questo sistema, mentre l'interazione tra EFH e Foxp3, seppur ancora rilevabile, risulta essere meno forte: EFH, infatti, interagendo con Foxp3, garantisce un tasso di sopravvivenza limitato, già a basse concentrazioni di antibiotico.

5.6 Prova di identità dell'interattore

Ciò che viene selezionato come interagente con Foxp3 è un motivo strutturale, riconducibile ad un dominio calcio legante. La successiva ipotesi di lavoro è quella di provare se effettivamente, tale dominio, possa appartenere alla calcineurina B.
Per tale motivo si è valutata la similitudine strutturale dei due domini analoghi, non solo per l'identità degli amminoacidi nelle stesse posizioni, ma anche per catene laterali analoghe in posizioni chiave (Fig.17).

```
 Score = 34.3 bits (77),  Expect = 3.7
 Identities = 26/100 (26%), Positives = 48/100 (48%), Gaps = 11/100 (11%)

Query  61   DTDGNGEVDFKEFIEGVSQFSVKGDKEQKLRFAFRIYDMDKDGYISNGELFQVLKMMVGN  120
            D D  G +D +EF   + +      +EQ+L   F   D ++DG+I   E+ Q  + + G
Sbjct  15   DADPYGGLDLEEFSRYLQE------REQRLLLMFHSLDRNQDGHIDVSEIQQSFRAL-GI  67

Query  121  NLKDTQLQQIVDKTIINADKDGDGRISFEEFCAVVGGLDI  160
            ++   Q ++I+     + D+DG   I ++E+     G  I
Sbjct  68   SISLEQAEKILH----SMDRDGTMTIDWQEWRDAASGKPI  103
```

Fig.17 Rappresentazione dell'omologia strutturale tra il dominio calcio legante della calcineurina B (Query) e dell'interattore isolato mediante *phage display*.

Seppur la similitudine non fosse estremamente elevata (26% come identità di singoli amminoacidi, 48% di identità per posizione di stesse cariche nelle stesse posizioni sensibili della proteina), si è proceduto ugualmente all'amplificazione del gene della calcineurina B e del suo dominio funzionale calcio legante, disegnando oligonucleotidi specifici che ne permettessero il successivo clonaggio nel vettore di espressione pGEX-mcs.

Le due proteine ricombinanti così prodotte, sono state testate con i medesimi saggi condotti precedentemente sull'interattore isolato. Le prove di interazione eseguite con questi esperimenti non hanno convalidato l'ipotesi che la calcineurina B, tramite il suo dominio calcio legante, possa interagire con il fattore trascrizionale Foxp3.

-Discussione

But I've still never found what I 'm looking for
U2

Gli ultimi studi in campo immunologico hanno, sempre di più, sottolineato l'importanza della presenza e del corretto funzionamento dei linfociti T regolatori per garantire il mantenimento dell'omeostasi del sistema immunitario. Il complesso programma funzionale di questo peculiare sottogruppo cellulare è finemente vincolato e regolato dal fattore trascrizionale Foxp3.

Quanto sia importante il ruolo di Foxp3 nell'impedire reazioni autoimmuni è provato anche dalla presenza di una grave e rara malattia genetica: l'IPEX (*Immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-Linked*). Tale patologia, infatti, è caratterizzata da mutazioni del gene *Foxp3* che non ne consentono la corretta espressione e/o funzione, portando, nei soggetti affetti, alla completa mancanza o all'alterato funzionamento delle cellule T regolatorie.

Le principali mutazioni, responsabili della comparsa dell'IPEX, sono localizzate all'interno del dominio funzionale di Foxp3 definito *forkhead*, necessario per la localizzazione nucleare [79], per il legame al DNA, e per il funzionamento come fattore trascrizionale. Non tutte le mutazioni che causano l'insorgenza di IPEX, tuttavia, sono localizzate in tale porzione della proteina [44]. Mutazioni al di fuori di questa zona non hanno una conseguenza diretta sul legame del fattore trascrizionale con il DNA (grazie a cui è possibile il suo ruolo di repressore o attivatore genico), ma possono comunque produrre un alterato funzionamento della proteina [80]. E' possibile che l'effetto patogenetico di queste mutazioni dipenda da un effetto sulla stabilità dell'intera molecola o sulla capacità di questa di interagire con altri partner molecolari che ne consentono, ad esempio, la regolazione e/o la programmazione [43].

Inoltre, vi sono condizioni patologiche, definite *IPEX-like* [81], in cui una sintomatologia analoga a quella riscontrata nei pazienti IPEX, anche se clinicamente meno severa, si verifica in assenza di mutazioni a carico del gene *Foxp3*. In questo caso è possibile che sia in gioco un difetto a carico di proteine che partecipano allo stesso *pathway* molecolare di FOXP3 o che interagiscono direttamente con esso nel programma regolatorio.

Per fare luce sull'intricato *network* molecolare che conduce all'attivazione di Foxp3, recentemente, sono stati utilizzati diversi approcci biomolecolari.
Solitamente si cerca di riprodurre *in vitro* le condizioni ottimali per la formazione di complessi tra Foxp3 e le eventuali proteine con esso interagenti. Questo tipo di studi necessitano poi che le potenziali interazioni siano confermate in altri modelli, il più fedelmente possibile vicini alla condizione fisiologica.
La ricerca di interattori molecolari, solitamente, non ha una metodica d'elezione, e spesso il risultato finale è influenzato dalla strategia selezionata [82]. Questo perché la struttura conformazionale delle proteine, che consente l'interazione reciproca, è dipendente dalle condizioni chimico-fisiche dell'ambiente in cui si verificano (ossidoriduzione, valore di pH, presenza di componenti minerali come il Ca^{2+}).

Anche in questa Tesi si è cercato di utilizzare diverse metodologie biomolecolari al fine di isolare nuove proteine reagenti con Foxp3. I risultati più interessanti, vista anche una certa precedente esperienza tecnologica, si sono concretizzati conducendo l'indagine grazie all'utilizzo di *phage display libraries*, sia di tipo anticorpale che di frammenti di cDNA.
Inoltre, come primo tentativo di prova fisiologica dei potenziali interattori ricavati, la riconferma dei risultati è stata ricercata mediante un approccio più fisiologico, di recente sviluppo: lo studio di complementazione in batteri (sistema del doppio ibrido).

A monte di tutto il progetto vi è la produzione, in forma ricombinante, della proteina Foxp3, protagonista centrale dell'indagine molecolare.
La qualità della proteina espressa e purificata è stata accertata grazie all'analisi con gel SDS-PAGE. Tale saggio mostra che la proteina ricombinante risulta del peso molecolare atteso, e che la procedura di espressione e purificazione utilizzata per la sua creazione in forma ricombinante ne permette di ottenere in sufficiente quantità ed in buona qualità (senza presenza eccessiva di proteine aspecifiche). L'identità della proteina sviluppata è stata confermata anche per mezzo di *western-blot,* utilizzando anticorpi monoclonali commerciali, diretti contro Foxp3.
La qualità del prodotto ricombinante ha permesso di pianificare una serie di esperimenti opportuni con cui ricerca nuovi potenziali interattori.

La prima parte è consistita nel ricercare interazioni tra la proteina ricombinante ed estratti proteici ottenuti da linfociti attivati e linfociti regolatori, utilizzando saggi di co-precipitazione ed immuno-precipitazione. Questa serie di esperienze hanno rilevato come non sia banale la scelta delle condizioni in cui si cerca di isolare un complesso di proteine interagenti, difatti la strategia utilizzata nel saggio di co-precipitazione si è rilevata inefficacie, mentre, avendo la disponibilità di anticorpi monoclonali altamente specifici, disponibili in commercio o isolati mediante *phage display*, il saggio di immunoprecipitazione garantisce l'identificazione di partner molecolari (noti) di Foxp3.
Un approccio diverso è stato il tentativo di isolare nuovi interattori molecolari mediante la selezione di librerie fagiche peptidiche. Abbiamo utilizzato, a tal scopo, librerie di cDNA precedentemente messe a punto: normalizzate, per evitare l'eccesso di alcune specie proteiche particolarmente abbondanti nel campione, e caratterizzate da una selezione di peptidi trascritti con la corretta cornice di lettura. La libreria utilizzata non risulta derivante da linfociti T regolatori, cellule specifiche per l'analisi di Foxp3, ma la possibilità di disporre di una libreria di qualità, con dimensioni di inserti che mediamente rappresentano quelle dei singoli domini funzionali ci ha suggerito, comunque, il suo utilizzo. Questa libreria consente, infatti, di analizzare non interi trascritti genici, ma singole porzioni funzionali, condivise da più proteine, spesso presenti anche in tessuti assai differenti. Inoltre, eventuali interattori risultanti da un tipo di analisi simile non risentono di *bias* sperimentali, visto il contesto poco specifico in cui sono stati identificati ed isolati.
Il risultato del lavoro condotto con la libreria di cDNA è stato il riconoscimento di un interattore molecolare abbastanza ben caratterizzabile. Un dominio calcio legante, EFH, presente in diverse proteine in cui svolge molteplici funzioni, tra cui il suo coinvolgimento nella mediazione di diversi segnali molecolari.
Curiosamente, l'utilizzo di questa strategia non ha portato al riconoscimento di interattori di Foxp3 già descritti in letteratura. Una possibile spiegazione può consistere dal fatto che applicare metodiche differenti non garantisce di identificare i medesimi interattori. Come già descritto [82], le diverse tecniche con cui si sceglie di condurre un'indagine di questo tipo, riproducono situazioni cellulari tra loro assai differenti, in cui possono verificarsi o meno diversi tipi di interazioni. Ad esempio, la coprecipitazione o l'immunoprecipitazione possono essere influenzati dalle varie soluzioni o tamponi utilizzati durante la prova

sperimentale. Può essere, pertanto, un effettivo vantaggio l'utilizzo di un sistema non condizionato da tali situazioni, come il *phage display*.
L'indagine sul dominio EFH è stata allargata rintracciando una possibile proteina candidata per interagire in maniera funzionale con Foxp3 e contenente, naturalmente, al suo interno un dominio funzionale analogo.
Tra la lista dei possibili candidati la scelta è ricaduta sulla calcineurina B, proteina essenziale per la traduzione del segnale anche nelle cellule linfocitarie [83] e nota per la sua interazione diretta con NFAT(C2) [78, 83], a sua volta già caratterizzato per essere un membro del macchinario molecolare con a capo Foxp3. Considerato anche che mentre Foxp3 interagisce con NFAT attraverso il dominio FKH, la compartecipazione della calcineurina B potesse avvenire grazie al legame del suo dominio EFH con il dominio Zn-finger di Foxp3, visto l'interazione specifica con questa struttura da parte del peptide da noi selezionato. Pertanto, per verificare l'ipotesi che l'interazione da noi identificata fosse dovuta alla calcineurina B, abbiamo espresso questa proteina sotto forma ricombinante, sia intera che solo nel suo dominio EFH e verificato la possibile interazione con Foxp3. I risultati ottenuti, in questo caso, non hanno riconfermato, purtroppo, quanto visto con il peptide derivato da libreria.

Questi dati non escludono tuttavia il possibile legame tra Foxp3 e la calcineurina B. E' possibile, ad esempio, che l'interazione si verifichi solo in determinate circostanze, ad esempio quando la calcineurina B è impegnata nel legame con altri fattori come NFAT o con altre proteine del macrocomplesso trascrizionale di Foxp3.
Eventualmente, si potrebbe tentare di utilizzare delle cellule eucariotiche in cui cercare di ricreare un ambiente, fisiologicamente più favorevole, in cui confermare o meno l'interazione ipotizzata tra Foxp3 e la calcineurina B.
Infatti, se da un lato l'approccio sperimentale utilizzato garantisce un'indipendenza dalla condizione del campione, dall'altro non permette l'analisi della interazione tra le proteine in presenza di altri potenziali interattori.

Appare chiaro, pertanto, che lo studio di fini meccanismi molecolari, come quelli che portano all'attivazione ed al funzionamento di un fattore trascrizionale come Foxp3, richiederà, sempre più, strumenti che ne permettano di analizzare contemporaneamente più

protagonisti biomolecolari.Sempre più si andranno a ricercare sistemi capaci di riprodurre un modello sperimentale che consenta l'analisi simultanea di tutte le potenziali interazioni tra le svariate proteine che partecipano ad un determinato processo biologico cellulare.

-Materiali e Metodi–

Abbreviazioni

NBT, NitroBlue Tetrazolium
BCIP, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
TMB, TetraMetilBenzidine
AP, Alkaline Phosphatase
HRP, HorseRadish Peroxidase
isoAA, isoAmylic Alcohol
DMSO, Dimetilsulfoxide
DTT, dithiothreitol
dNTPs, deoxynucleotides
BSA, Bovine Serum Albumine
IPTG, Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
PPB, Periplasmic Buffer
PEG, polietilenglicole
RT, Room Temperature
O/N, Over Night
FCS, Fetal Calf Serum

Soluzioni e tamponi

Tampone TAE per elettroforesi di DNA su gel di agarosio
0,04 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA.

Tampone TBE per elettroforesi di DNA su gel di agarosio
0,04M Tris-borato; 0,001 M EDTA.

Terreno liquido 2xTY per batteri
16 g Bacto-tryptone, 10 g Bacto-yeast, 5 g NaCl, finale pH 7,0. Se richiesto, ampicillina 0,1 mg/ml, cloramfenicolo 0,034 mg/ml.

Terreno 2xTY per piastre agar
16 g Bacto-tryptone, 10 g Bacto-yeast, 5 g NaCl, 15 g Bacto-agar, finale pH 7,0. Se richiesto, ampicillina 0,1 mg/ml, cloramfenicolo 0,034 mg/ml.

Terreno 2xTY per piastre agar per la selezione delle ORF
16 g Bacto-tryptone, 10 g Bacto-yeast, 5 g NaCl, 15 g Bacto-agar, ampicillina 0,02 mg/ml, cloramfenicolo 0,034 mg/ml, finale pH 7,0.

Soluzione di Glucosio 20X (= 0,4 M = 0,2 g/ml)
200 g di glucosio in 1 l di H2O mQ. Filtrare con filtro 0,2 µm.

Terreno SOB per crescita batterica
20 g/l di Bacto-trypton + 5 g/l Bacto-yeast extract + 0,5 g/l NaCl + KCl 2,5 mM in
1 l di H2O mQ. Autoclavare. Raffreddare e aggiungere MgCl2 10 mM + MgSO4 10 mM.

Terreno SOC per crescita batterica
Mescolare 950 ml di SOB e 50 ml di glucosio 20X.

Tampone di Lisi
20mM TrisHCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 0,1% Triton X100, 5mM imidazolo, lisozima 1mg/g batteri.

TSS per la preparazione di cellule E.coli competenti
85% 2xTY, 10% PEG-8000. 5% DMSO, 50mM $MgCl_2$. Filtrare con filtro 0,2µm.

Glycerol Buffer per la preparazione di cellule E.coli competenti
10% glicerolo in acqua milli-Q. Autoclavare prima dell'uso.

Tampone salino fosfato (PBS)
8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na_2HPO_4, 0.24 g KH_2PO_4 in 1l H_2O, finale pH 7.4.

PBST
PBS aggiunto con 0,1% Tween 20

MPBS
PBS aggiunto con 2% di latte scremato in polvere.

PPB per l'estrazione della frazione periplasmica
200mg/ml Saccarosio, 1mM EDTA, 30mM tris-Hcl pH 8,0.

Ceppi batterici

I ceppi batterici utilizzati in questo studio:
- *Escherichia coli* DH5αF' (Gibco BRL), F'/*endA1 hsd17* (rK− mK+) *supE44 thi-1 recA1 gyrA* (Nalr) *relA1* _ (*lacZYA-argF*) *U169 deoR* (F80*dlacD*-(*lacZ*)*M15*)

- *Escherichia coli* BS1365, BS591 F' Kan [BS591: *recA1 endA1gyrA96 thi-1 D lacU169 supE44 hsdR17* (*lambda1mm434 nin5 X1-cre*)] (cre recombinase espressa in maniera costitutivamente).

Risultati, capitolo 1

Isolamento dei linfociti e conta cellulare
L'isolamento dei linfociti avviene da sangue periferico eparinato, mediante separazione per densità, ottenuta per sedimentazione di polimero (Ficoll). Il sangue viene diluito 1:1 con soluzione fisiologica per evitare aggregati cellulari. La soluzione di Ficoll/Hypaque viene posta sulla superficie lentamente. Si procede a centrifugazione 560g x 30' a RT. Avvenuta la stratificazione delle cellule del sangue in base alla densità. Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC: *periferal blood mononucleated cell*), meno dense del Ficoll, formano un anello biancastro all'interfaccia tra il plasma ed il polimero.
Prelevate le cellule PBMC si effettuano due lavaggi con soluzione fisiologica. Si risospendono quindi le cellule in soluzione fisiologica e si procede con la conta cellulare, utilizzando una cameretta contacellule o camera di Burker.

Purificazione RNA totale
Per la purificazione dell'RNA totale si è utilizzato il kit commerciale Purescript RNA Purification Kit (Gentra), seguendo le istruzioni previste per un numero di cellule compreso tra $2x10^5$ e $5x10^5$.

Sintesi di cDNA
Miscela di reazione:
- 1 µl di primers esametrici casuali (100 ng/µl)
- 2 µl di RNA totale (1 µg)
- 9 µl di acqua sterile distillata

La miscela viene incubata a 70°C per 10' e rapidamente raffreddata in ghiaccio. Vengono aggiunti:
- 4 µl di tampone 5x per la sintesi del primo filamento (250 mM Tris-HCl pH 8.3)
- 2 µl 100 mM di DTT
- 1 µl 100 mM di miscela di dNTPs (10 mM ognuno)
- 1 µl (200 unità) SuperscriptII (Gibco BRL RNAsi H-MLM transcriptasi inversa).

L'incubazione viene eseguita a 25°C per 10'. Questo permette agli oligonucleotidi di essere estesi prima dell'incubazione a 42°C che li potrebbe denaturare.
La miscela viene incubata a 42°C per 50' e quindi inattivata a 70°C per 10'.

PCR (Polymerase chain reaction)
Si è utilizzata la HotStart DNA polymerase (QiaGen).
Mix di reazione:

campione di DNA 0,01-1 ng (cDNA)
primers Sense 0,5 pmol/µl
primers Antisense 0,5 pmol/µl
QiaGen Buffer 10x
dNTPs 0,25 mM
$MgCl_2$ 2 mM
HotStart Polymerase 0,025 units/µl
H_2O fino a 20µl

Sono stati eseguiti i sequenti cicli di amplificazione

Denaturazione del campione, 15' a 95°C
31 cicli di denaturazione, 30" a 95°C; annealing, 30" a 60°C; allungamento, 1' ogni 1Kpb a 72°C
Allungamento finale 10' a 72°C

Fox His sense	CGATTCTCGAGCATGCCCAACCCCAGGCCTGGC
Zinc His sense	CGATTCTCGAGCGCCAGCCTGGAATGGGTGTCC
FKH His sense	CGATTCTCGAGCCGACCCCCTTTCACCT
Fox Mal sense	CGATTGAATTCCATGCCCAACCCCAGGCCTGGC
Zinc Mal sense	CGATTGAATTCCGCCAGCCTGGAATGGGTGTCC
FKH Mal sense	CGATTGAATTCCCGACCCCCTTTCACCT
FoxP3 anti	TTAGCAAGCTTTCAGGGGCCAGGTGTAGGG
N-term anti	TTAGCAAGCTTTCAGGCGTGGGCATCCACCGTTGAG
Zinc anti	TTAGCAAGCTTATTAGATGGTCCGCCTGGC

Tab.1 Elenco dei *primers* utilizzati per il clonaggio di Foxp3 e dei suoi domini funzionali. Per i primers *sense* si sono scelti i siti di restrizione XhoI (per pTrcHisB) e EcoRI (per pMal-C2). Per entrambi i vettori il sito HindIII per i *primers* antisenso. Si sono aggiunte le necessarie basi azotate per garantire la giusta cornice di lettura ed il termine esatto dei frammenti.

Elettroforesi del DNA su gel di agarosio
Gel di agarosio (Sigma) con una concentrazione di 2% in tampone TAE sono stati utilizzati per separare i prodotti di PCR. 1 µl di etidio bromuro (Sigma) sono stati aggiunti a 30 ml di gel di agarosio.
Marker di pesi molecolari da 100 bp utilizzati per la determinazione dei pesi molecolari.

Purificazione del DNA
I kit QiaGen agore e QiaGen Pcr (QIAGEN) sono stati utilizzati per la purificazione del DNA dal gel di agarosio o da miscele di reazione, seguendo le istruzioni dei kit.

Digestione del DNA con enzimi di restrizione
Tutti gli enzimi di restrizione sono stati forniti dalla New England Biolabs.
Miscela di reazione:
DNA
NEB Buffer 10x
BSA 100x
Enzima di restrizione 1 unit / µg di DNA

H2O fino a 50 µl

La reazione viene mantenuta almeno 1 ora alla temperatura richiesta dallo specifico enzima di restrizione.

DNA Fingerprinting
La miscela per la digestione enzimatica del DNA è stata preparata come descritto nel precedente paragrafo, è stato aggiunto un uguale volume della miscela di reazione di PCR. Tutti gli esperimenti di fingerprinting del DNA sono stati condotti utilizzando l'enzima BstNI.

Ligasi
Il DNA del vettore plasmidico e l'inserto di DNA sono stati dosati in rapporto 1:3 (numero di molecole). La T4 DNA ligasi è stata fornita dalla New England Biolabs.
Miscela di reazione:
- DNA (circa 100ng)
- T4 ligase Buffer (NEB) 10x
- T4 DNA ligase(NEB), 1 unità
- H2O fino a 10 µl

Incubazione a 16°C O/N

Preparazione di *E.coli* competenti
50 ml di una coltura *E.coli* , ceppo DH5α, vengono fatti crescere a 37°C in terreno 2xTY liquido a OD_{600} 0,5. I batteri vengono raffreddati in ghiaccio per bloccare la crescita, centrifugati a 4°C per 5' a 1200 rpm, il surnatante viene eliminato e il pellet di batteri risospeso in 5 ml di soluzione TSS. Le cellule competenti sono state immediatamente utilizzate o conservate a -80°C fino a 4 settimane.

Trasformazione dei batteri
5 µl della miscela di ligasi vengono trasferiti dentro una provetta contenente 100 µl di cellule *E.coli* competenti. La miscela è stata incubata in ghiaccio per 20'. Lo shock termico è stato eseguito a 42°C per 1 minuto, i batteri sono stati poi raffreddati in ghiaccio per 2 minuti, risospesi in 1 ml di terreno liquido e messi a crescere in assenza di antibiotici selettivi per 1 ora a 37°C. I batteri vengono quindi piastrati su piastre di agar contenenti l'anitbiotico e fatti crescere O/N a 30°C.

Sequenziamento di DNA
I prodotti di PCR vengono purificati mediante trattamento con enzimi Exo/SAP:
- 3-5 µl della reazione di PCR
- 1 µl della miscela di enzimi Exo/SAP (AB Biosystem)
- H_2O per raggiungere il volume di 7 µl

La reazione viene condotta a:
- 37°C per 15'
- 85°C per 15'

Dopo purificazione la miscela di reazione di sequenza è composta nel seguente modo:
- 50-100 ng di prodotto di PCR purificato
- 1 µl di primer (3,2 pmol/µl)
- 2 µl di Terminator Mix (Applied Biosystems, BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit)
- 2 µl di tampone 5x
- H_2O per raggiungere il volume di 10 µl

Il programma di sequenziamento:
- 1' a 96°C
- 25 cicli :15'' a 96°C; 5'' a 50°C; 4' a 60°C

Le reazioni vengono ulteriormente purificate:
- aggiunta di 3 µl di sodio acetato 3M pH 5;
- una trasferimento in provetta contenete 55 µl di etanolo assoluto;
- congelamento a -20°C per 10';
- centrifugazione a 14000 rpm per 15' a 4°C;

- eliminazione del surnatante e risospensione del pellet in 200 µl di soluzione 70% etanolo;
- centrifugazione a 14000 rpm per 15' a 4°C;
- eliminazione del surnatante. Asciugare il pellet a 60°C per 15';
- Risospensione del campione in 10 µl di H_2O MilliQ;
- Aggiunta di 20 µl di formammide.

Il campione così trattato viene caricato su sequenziatore 3100 Genetic Analyzer sequencer (ABI PRISM-HITACHI).

Estrazione del DNA plasmidico
Il kit Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel) è stato utilizzato per mini preparazione di DNA plasmidico (da 1 a 5 ml di coltura batterica cresciuta O/N). Per preparazioni di maggiori quantità di DNA plasmdico è stato usato il kit QiaColture (da 50 a 100 ml di coltura batterica cresciuta O/N).

Produzione e purificazione delle proteine di fusione MBP
Una singola colonia batterica contenete il plasmide di interesse viene incubata in 400 ml di terreno 2xTY, con ampicillina a 37°C fino a OD_{600} 0,5; l'espressione della proteina ricombinante viene indotta aggiungendo 0,2 mM di IPTG ed i batteri cresciuti a 28°C O/N. Il giorno successivo, le frazioni citoplasmatiche solubili contenenti la proteina ricombinante sono estrette come segue:

- la coltura batterica viene centrifugata per 20' a 8000 rpm, il supernatante viene scartato ed il pellet risospeso in 10 ml di tampone di lisi per ogni grammo di batteri.
- la soluzione viene incubata in ghiaccio per 45' in agitazione.
- 20-50 µg/ml di DNAsi (Sigma) vengono aggiunti al lisato ed incubato in ghiaccio, in agitazione per 45'.
- Dopo centrifugazione per 15' a 11000 rpm, il surnatante viene raccolto e filtrato con filtro da 0,45 µm.

Per purificare la proteina di fusione MBP dall'intero lisato batterico, viene effettuato una cromatografia di affinità usando resina di amilosio (NEB), seguendo le istruzioni del fornitore. In breve:

- 1 ml di resina di amilosio viene aggiunto al lisato batterico ed incubata per 30' in rotazione, per permettere il legame della proteina di fusione con l'MBP all'amilosio
- La resina viene impaccata in una colonna da 10 ml e lavata con una soluzione 20mM TrisHCl pH 8,0, 500 mM NaCl.
- L'eluizione viene eseguita con una soluzione di maltosio 10 mM e le frazioni eluite (0,5 ml ognuna) vengono controllate per la presenza della proteina mediante Bradford.
- Le frazioni con la proteina purificata vengono unite e dializzate O/N in PBS.

Risultati, capitolo 2

Coprecipitazione con proteina ricombinante FOXP3-MBP
Il saggio di coprecipitazione si basa sui principi di affinità tra la parte MBP della proteina ricombinante e la resina di amilosio. Il protocollo:

- aggiungere di soluzione PBS (10 volumi)
- centrifugare (1500 rpm per 5') e risospendere in ugual volume di partenza della resina in PBS.
- per evitare che proteine non specifiche vengano selezionate dalla resina, il lisato cellulare viene pretrattato con 100µl di resina di amilosio in rotazione per 1h a 4°C.
- centrifugare 1' a 13000rpm
- raccogliere il surnatante. Aggiungere soluzione di FOXP3-MBP in rapporto 1:1. 1h a 4°C in rotazione
- Aggiungere 50 µl di amylose resin.
- 1h a 4°C in rotazione
- Centrifugare 30'' a 12000rpm
- Lavare con o PBS: 3 volte per centrifugazione, non toccando mai la resina.
- risospendere direttamente in buffer per gel SDS-PAGE

SDS-PAGE
A 10 µl di volume del campione da analizzare si aggiunge un uguale volume di tampone di caricamento SBC 2x. Il campione viene quindi denaturato mediante incubazione a 100°C per 5-10'.
Il campione viene esaminato mediante SDS-PAGE, come descritto da Laemmli [84], con gel al 12% in tampone Tris-Glicina 1x (2,5 mM Tris; 250 mM Glicina pH 8,3; 0,1% SDS) a 150 Volts costanti.
Per fissare ed evidenziare le proteine, a termine corsa il gel viene colorato mediante una soluzione di Brillant Blue Comassie.

Analisi proteica quantitativa
Le immagini dei gel vengono trasformate in file digitali mediante scanner. Tali file vengono poi analizzati con software QuantityOne (Biorad) ,che permette di visualizzare, in forma di picchi quantificabili, le proteine rilevate da SDS-PAGE, consentendo il confronto tra diversi campioni.

Risultati, capitolo 3

Estrazione proteine cellulari
Circa $5x10^7$ cellule per ogni campione sono state trattate con soluzione CellLytic (Sigma). Seguendo il protocollo del produttore, si sono estratte, in forma solubile, le proteine cellulari.

Immuno Blot
Proteine corse in SDS-PAGE vengono trasferite su una membrana di nitrato di cellulosa mediante metodica di Western Blot. L'avvenuto trasferimento viene valutato colorando la membrana con colorante per proteine reversibile Rosso Ponceau (0,1% Ponceau S (w/v); 5% acido acetico (v/v)).
A seguire:
- saturare la membrana incubandola in latte 2% in agitazione per 1h a RT;
- incubazione con l'anticorpo primario diluito 1:2000 in latte 2% in agitazione per 1h a RT;
- lavare la membrana, per rimuovere l'eccesso di anticorpo, una volta con soluzione PBS 1x – Tween 0,1% per 5' e 2 volte con PBS 1x per 5' sempre a RT;
- incubazione con anticorpo secondario diluito 1:2000 in latte 2% in agitazione 1h a RT;
- lavare nuovamente la membrana;
- sviluppare la reazione sulla membrana mediante immersione in 10 ml di soluzione di sviluppo per la fosfatasi alcalina (1M Tris pH 9,5; 5M NaCl; 0,05 M $MgCl_2$) con aggiunta di soluzione di substrato NBT/BCIP 50x;
- bloccare la reazione con aggiunta di H_2O.

Risultati, capitolo 4

Libreria anticorpale fagica
La libreria utilizzata è stata ottenuta da linfociti di sangue periferico ottenuti da donatori sani [74]

Produzione e selezione di fagi dalla libreria
- Inoculare 10-20 µl della libreria in 10 ml di 2xYT + Ampicillina (Amp) 1% + glucosio 1% in modo da partire da una OD_{600} iniziale = 0.05 (la rappresentatività della diversità è garantita).
- Far crescere in agitazione a 37°C fino a DO_{600} = 0.5.
- Infettare con fago *helper* in rapporto MOI fago:batteri di 100:1 e lasciare fermo per 45' a 37°C.
- Centrifugare a 3000 rpm per 15' a RT.
- Eliminare il sopranatante e risospendere il *pellet* in 50 ml di 2xYT + Amp 1% + Kanamicina (Kan) 1%.
- Far crescere in agitazione O/N a 28°- 30°C.
  COATING: saturare un immunotubo con l'antigene (Foxp3-MBP) 10 µg/ml diluito in 500 µl - 1 ml di PBS 1X e lasciare O/N a 4°C.

2° Giorno
- Centrifugare a 7000-8000 rpm per 20' a 10°C.
- Aggiungere a 40 ml del sopranatante 10 ml di PEG-NaCl sterile.
- Lasciar precipitare in ghiaccio per 45', agitando ogni tanto.
- Centrifugare a 5000 rpm per 20'.

- Eliminare il sopranatante e risospendere il *pellet* in 1 ml di PBS 1X; trasferire in una provetta da 1,5 ml.
- Centrifugare a 13000 rpm per 5' e recuperare 900 µl di fagi presenti nel sopranatante.
- Saturare i fagi 1:1 in latte 4% per 45'-1h a T ambiente; contemporaneamente svuotare l'immunotubo e saturarlo completamente con latte 2%.
- Inoculare 1 colonia di DH5αF' da piastra fresca in 5 ml di 2xYT (OD_{600} iniziale = 0.05). Far crescere in agitazione a 37°C fino a OD_{600} = 0.5.
- Al termine della saturazione svuotare l'immunotubo e aggiungere 500 µl - 1 ml (pari al volume usato per il *coating*) dei fagi saturati in latte.
- Incubare in rotazione per 30' e fermo 1h 30' a RT.
- Svuotare l'immunotubo e fare 5 lavaggi con PBS 1X - Tween 0.1% e 5 con PBS 1X.
- Svuotare l'immunotubo e mettere 500 µl - 1 ml di DH5αF' a DO600 = 0.5.
- Lasciare infettare per 45' a 37°C.
- Piastrare su piastre 2xYT + Amp 1% + glucosio 1%: 200 µl di DH5αF' per controllare l'assenza di contaminazioni; 500 µl - 1 ml delle cellule DH5αF' infettate coi fagi (1° *output*); una diluizione per calcolare la titolazione della 1° selezione.
- Far crescere le piastre O/N a 37°C.

3° Giorno

- Raccogliere il 1° output in 1 ml di 2xYT. Aggiungere glicerolo sterile fino alla concentrazione massima del 20%. Conservare a -80°C.
- Ripetere i passaggi del 1° Giorno partendo da un inoculo del 1° output.
  COATING: saturare un immunotubo con l'antigene (Foxp3) 10 µg/ml diluito in 500 µl - 1 ml di PBS 1X e lasciare O/N a 4°C.

4° Giorno

Procedere come il 2° Giorno ma aumentando la stringenza dei lavaggi (maggior numero di lavaggi con PBS e PBST). Se si vuol procedere con un terzo ciclo di selezione i lavaggi vanno resi ulteriormente più stringenti.

Phage ELISA

Il phage ELISA è stato eseguito per identificare i scFv capaci di riconoscere Foxp3. Per garantire la specificità del riconoscimento anticorpale la reattività verso Foxp3-MBP è stata messa in relazione con la reattività verso il solo tag della fusione (MBP).

- Preparare una *master plate* in una piastra da 96 pozzetti mettendo in ciascuno 120 µl di 2xYT + Amp 1% + glucosio 1% + 1 colonia prelevata dalla piastra della 2° selezione.
- Far crescere in agitazione a 37°C.
- Duplicare la *master plate* in una seconda piastra da 96 pozzetti mettendo in ogni pozzetto 100–110 µl di 2xYT + Amp 1% + glucosio 1% e rispettivamente 20-10 µl del corrispondente pozzetto della *master plate*.
- Far crescere in agitazione a 37°C fino a OD_{600} = 0.5.
- Infettare con fago *helper* in modo che il rapporto MOI fago:batteri sia 100:1 e lasciare fermo per 45' a 37°C.
- Centrifugare a 1500 rpm per 20'.
- Eliminare il sopranatante.
- Risospendere il *pellet* in 140 µl di 2xYT + Amp 1% + Kan 1 %.
- Far crescere in agitazione O/N a 28°- 30°C.
  COATING: saturare i pozzetti di una piastra per ELISA con l'antigene (htTG) 10 µg/ml diluito in 100 µl di PBS 1X e lasciare O/N a 4°C.

  Giorno successivo
- Svuotare e saturare la piastra del coating con 120 µl per pozzetto di latte 2% per 45' a T ambiente.
- Centrifugare la seconda piastra da microtitolazione (con la coltura O/N) a 1500 rpm per 15'.
- Svuotare il latte dalla piastra per ELISA.
- Incubare con 100 µl per pozzetto di anticorpo primario (fagi) dato dal surnatante diluito 1:1 in latte 4% per 1h 30' a T ambiente.
- Svuotare e fare 3 lavaggi con PBS 1X - Tween 0.1% e 3 con PBS 1X.
- Incubare con 100 µl per pozzetto di anticorpo secondario (anti M13-HRP) diluito 1:2000 in latte 2% per 1h-1h 30' a T ambiente.
- Svuotare e fare 3 lavaggi con PBS 1X - Tween 0.1% e 3 con PBS 1X.
- Sviluppare con 65 µl per pozzetto di TMB (3',3',5',5' tetrametilbenzidina diidrocloruro) - tampone di sviluppo per la perossidasi.

- Bloccare la reazione con 35 µl per pozzetto di acido solforico (H2SO4) 1M.
- Eseguire la lettura a 450 nm.

I cloni risultati positivi vanno riconfermati. La *master plate* e i singoli cloni vanno conservati a -80°C aggiungendo glicerolo sterile fino alla concentrazione massima del 20%.

Fingerprinting e sequenziamento dei cloni positivi
I geni delle zone variabili dei cloni positivi per la reattività verso Foxp3 sono stati amplificati mediante PCR utilizzando i *primers* specifici [73]. I prodotti di amplificazione sono stati sequenziali e le famiglie VH e VL dei cloni isolati sono state analizzate grazie al database disponibile ondine VBASE (http://www.mrccpe.cam.ac.uk/imt-doc/restricted/ok.html).

Costruzione dell'anticorpo anti-Foxp3 in forma di minibody.
Il vettore commerciale pcDNA3.1-Hygro, è stato modificato in modo da consentire il clonaggio di sequenze geniche di *single-chains* anticorpali mediante enzimi di restrizione BssHII e NheI. Il vettore, inoltre, permette di fondere assieme alle zone variabili le catene costanti CH2-CH3 di origine murina.
Viene amplificato in PCR l'inserto (scFv) presente nel vettore pDAN. Dopo purificazione e taglio con gli opportuni enzimi di restrizione dell'inserto e del vettore pcDNA3.1-Hygro si procede con la reazione di ligasi.

Transfezione e selezione di cellule HEK293T
La linea cellulare derivata da rene umano HEK293T è stata posta in coltura in terreno D-MEM (Gibco) aggiunto con 10% di FCS. Le cellule vengono raccolte e piastrate in una piastra da 24 pozzetti ($2x10^5$ cellule per pozzetto). Dopo 24 ore si è proceduto alla transfezione transiente: in 50 µl di D-MEM senza FCS viene risospeso 1 µg di DNA plasmidico purificato; la miscela viene unita a 50 µl di D-MEM in cui sono disciolti 2 µl di Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Dopo incubazione di 20' a RT, la miscela viene aliquotata in ogni pozzetto di cellule in coltura. Le cellule vengono lasciate crescere per 24/72 ore e i sopranatanti controllati per la produzione di *minibody* (MB). Le linee stabili sono state ottenute procedendo nel medesimo modo, ma diluendo 1:10 con terreno di coltura fresco le cellule a 24 ore dalla trasfezione e aggiungendovi 400 µg/ml di antibiotico G418 (Gibco) per la selezione delle cellule resistenti alla neomicina. Dopo 10 giorni di coltura, la concentrazione di G418 viene ridotta a 200 µg/ml.
I sopranatanti delle colture cellulari vengono usati in diluizione 1:1 come reagenti per i saggi ELISA o di immunoprecipitazione che necessitano dell'anticorpo anti-Foxp3 prodotto in forma di MB.

Risultati, capitolo 5

Libreria fagica di cDNA
La messa a punto della libreria di cDNA è stata effettuata con la stretta collaborazione del Laboratorio di Biologia del Professor Roberto Marzari. In particolare la messa a punto è stata eseguita dal Dott. Roberto DiNiro, il lavoro eseguito è in revisione per una prossima pubblicazione, per cui non si è ritenuto opportuna la descrizione minuziosa dei vari passaggi, ma si rimanda alla letteratura (Di Niro et al. In revisione).

Selezione della libreria fagica di cDNA
Le selezioni sono state eseguite in maniera analoga a quanto descritto per le librerie fagiche anticorpali. La sostanziale differenza è consistita nell'effettuare, per ogni ciclo di selezione, una prima selezione negativa, in cui sull'immunotubo era presente la sola proteina MBP. In questo caso non si recuperano i fagi legati alla proteina, ma i fagi presenti ancora in soluzione. Questi fagi subiscono il ciclo di selezione vero e proprio (selezione positiva), attuato con degli immunotubi attivati con la proteina Foxp3-MBP.
Anche in questo caso, a seguito di tre cicli di selezione, la reattività dei cloni è stata valutata con *phage*-ELISA, valutando l'interazione sia con Foxp3-MBP che con la sola proteina MBP.

Clonaggio nel vettore di espressione pGEX-mcs
L'amplificazione con PCR, purificazione del prodotto di reazione, taglio enzimatico di inserti e vettore sono stati eseguiti in maniera analoga a quanto descritto precedentemente per il gene Foxp3 ed i suoi domini funzionali.
Per quanto riguarda l'interattore identificato, l'amplificazione è stata eseguita con oligonucleotidi esterni al MCS del vettore fagico della libreria (Di Niro et al. In pubblicazione). Tali frammenti hanno alle estremità siti di restrizione idonei per il clonaggio nel vettore pGEX-mcs.

Gli oligonucleotidi utilizzati per il vettore pGEX-mcs, che consente l'espressione della proteina ricombinante con la GST (*Glutathion-S-Transferase)*, sono riportati in tabella 2.

BssH-CalcB Primer sense	GTTGGCGCGCCAATGGGAAATGAGGCAAGTTA
NheI-Calc B Anti-sense	GCCTAGCTAGCCACATCTACCACCATCTTTT
BssH-EFH Primer sense	GTTGGCGCGCCAGACACAGATGGGAATGGAGA
NheI-EFH Anti sense	GCCTAGCTAGCGATATCTAGGCCACCTACAA

Tab.2 Elenco dei *primers* utilizzati per il clonaggio di calcineurina B e del suo dominio funzionale EFH. Per i primers *sense* si sono scelti i siti di restrizione BssHII, NheI per i *primers* antisenso. Si sono aggiunte le necessarie basi azotate per garantire la giusta cornice di lettura ed il termine esatto dei frammenti.

Produzione e purificazione delle proteine di fusione GST

Una singola colonia batterica contenete il plasmide di interesse viene incubata in 400 ml di terreno 2xTY, con ampicillina, a 37°C fino a OD_{600} 0,5; l'espressione della proteina ricombinante viene indotta aggiungendo 0,2 mM di IPTG ed i batteri cresciuti a 28°C O/N. Il giorno successivo, le frazioni citoplasmatiche solubili contenenti la proteina ricombinante sono state estretta come segue:

- centrifugare la coltura batterica per 20' a 8000 rpm, il supernatante viene scartato ed il pellet risospeso in 10 ml di tampone di lisi per ogni grammo di batteri.
- Incubare la soluzione in ghiaccio per 45' in agitazione.
- Aggiungere 20-50 µg/ml di DNAsi (Sigma) al lisato ed incubato in ghiaccio, in agitazione per 45'.
- Centrifugare per 15' a 11000 rpm, il surnatante e raccogliere e filtrare con filtro da 0,45 µm la porzione solubile.

Per purificare la proteina di fusione GST dall'intero lisato batterico, viene effettuato una cromatografia di affinità usando resina coniugata con glutatione (Sigma). In breve:

- Aggiungere 1 ml di resina con glutatione al lisato batterico ed incubare per 30' in rotazione, per permettere il legame della proteina di fusione con la resina.
- Impaccare la resina in una colonna da 10 ml e lavare con una soluzione PBS a pH 8.
- Eseguire l'eluizione con soluzione di glutatione ridotto 50 mM diluito in PBS e con un pH finale di 8. Controllare le frazioni eluite (0,5 ml ognuna) per la presenza della proteina mediante Bradford.
- Unire e dializzare le frazioni con la proteina purificata O/N in PBS.

Saggio di interazione mediante Dot-Blot.

- Immobilizzare le proteine ricombinanti prodotte su membrana di nitrocellulosa attivata.
- Incubare O/N a 4°C con la proteina Foxp3 ricombinante.
- Lavare la membrana (5' con PBST in agitazione e 5' con PBS).
- Incubare con anticorpo anti-Foxp3 (R&D) diluito 1:1000, per 1 ora a RT.
- Effettuare nuovamente i lavaggi.
- Incubare con anticorpo anti-capra coniugato a fosfatasi alcalina per il rilevamento dell'anticorpo primario, per 1 ora a RT.
- Effettuare nuovamente i lavaggi.
- Sviluppare con substrato per la fosfatasi alcalina.

Saggio di interazione mediante ELISA

- *Coating* O/N a 4°C di pozzetti attivati con la proteina ricombinante.
- Incubare per 3 ore a 4°C con la proteina Foxp3 ricombinante.
- Lavare la membrana (5' con PBST in agitazione e 5' con PBS).
- Incubare con anticorpo anti-Foxp3 (R&D) diluito 1:1000, per 1 ora a RT.
- Effettuare nuovamente i lavaggi.
- Incubare con anticorpo anti-capra coniugato a fosfatasi alcalina per il rilevamento dell'anticorpo primario, per 1 ora a RT.
- Lavaggio Effettuare nuovamente i lavaggi.

Sviluppare con substrato per la fosfatasi alcalina.

-Bibliografia–

1. **Morahan, G. and L. Morel, *Genetics of autoimmune diseases in humans and in animal models.* Curr Opin Immunol, 2002. 14(6): p. 803-11.**

2. **von Boehmer, H. and P. Kisielow, *Self-nonself discrimination by T cells.* Science, 1990. 248(4961): p. 1369-73.**

3. **Tang, A.M., et al., *Increasing risk of 5% or greater unintentional weight loss in a cohort of HIV-infected patients, 1995 to 2003.* J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. 40(1): p. 70-6.**

4. **Rocha, B. and H. von Boehmer, *Peripheral selection of the T cell repertoire.* Science, 1991. 251(4998): p. 1225-8.**

5. **Kisielow, P., et al., *Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes.* Nature, 1988. 333(6175): p. 742-6.**

6. **Anderson, M.S., et al., *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein.* Science, 2002. 298(5597): p. 1395-401.**

7. **Goldrath, A.W. and M.J. Bevan, *Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire.* Nature, 1999. 402(6759): p. 255-62.**

8. **Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death.* Nat Cell Biol, 2002. 4(5): p. E131-6.**

9. **Goverman, J., et al., *Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity.* Cell, 1993. 72(4): p. 551-60.**

10. **Chen, L., *Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity.* Nat Rev Immunol, 2004. 4(5): p. 336-47.**

11. **Sakaguchi, S., et al., *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease.* Immunol Rev, 2006. 212: p. 8-27.**

12. **Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.* Nat Immunol, 2005. 6(4): p. 345-52.**

13. **Apostolou, I. and H. von Boehmer, *In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells.* J Exp Med, 2004. 199(10): p. 1401-8.**

14. **Tang, Q., et al., *Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function.* Eur J Immunol, 2004. 34(11): p. 2996-3005.**

15. **Shevach, E.M. and G.L. Stephens, *The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity?* Nat Rev Immunol, 2006. 6(8): p. 613-8.**

16. **Bluestone, J.A. and Q. Tang, *How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity?* Curr Opin Immunol, 2005. 17(6): p. 638-42.**

17. **Meyer, B., et al., *[2 cases of neonatal diabetes].* Ann Pediatr (Paris), 1970. 17(8): p. 569-73.**

18. **Powell, B.R., N.R. Buist, and P. Stenzel, *An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy.* J Pediatr, 1982. 100(5): p. 731-7.**

19. **Clark, L.B., et al., *Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant.* J Immunol, 1999. 162(5): p. 2546-54.**

20. **Bennett, C.L., et al., *X-Linked syndrome of polyendocrinopathy, immune dysfunction, and diarrhea maps to Xp11.23-Xq13.3.* Am J Hum Genet, 2000. 66(2): p. 461-8.**

21. **Chatila, T.A., et al., *JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic disregulation syndrome.* J Clin Invest, 2000. 106(12): p. R75-81.**

22. **Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.* Nat Genet, 2001. 27(1): p. 68-73.**

23. **Godfrey, V.L., et al., *Fatal lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mouse requires T cells that mature in a sf thymic environment: potential model for thymic education.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(13): p. 5528-32.**

24. **Hori, S., T. Takahashi, and S. Sakaguchi, *Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells.* Adv Immunol, 2003. 81: p. 331-71.**

25. **Fontenot, J.D., et al., *Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3.* Immunity, 2005. 22(3): p. 329-41.**

26. **Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.* Nat Immunol, 2003. 4(4): p. 330-6.**

27. **Williams, L.M. and A.Y. Rudensky, *Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3.* Nat Immunol, 2007. 8(3): p. 277-84.**

28. **Kim, J.M. and A. Rudensky, *The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells.* Immunol Rev, 2006. 212: p. 86-98.**

29. **Hsieh, C.S., et al.,** ***An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires.*** **Nat Immunol, 2006. 7(4): p. 401-10.**

30. **Gavin, M.A., et al.,** ***Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation.*** **Nature, 2007. 445(7129): p. 771-5.**

31. **de Kleer, I.M., et al.,** ***CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis.*** **J Immunol, 2004. 172(10): p. 6435-43.**

32. **Yang, Z.Z., et al.,** ***Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma.*** **Blood, 2006. 107(9): p. 3639-46.**

33. **Johnson, H.M., et al.,** ***Trafficking and signaling pathways of nuclear localizing protein ligands and their receptors.*** **Bioessays, 2004. 26(9): p. 993-1004.**

34. **Kadonaga, J.T.,** ***Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors.*** **Cell, 2004. 116(2): p. 247-57.**

35. **Weigelt, J., et al.,** ***Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FOXO4).*** **Biochemistry, 2001. 40(20): p. 5861-9.**

36. **Li, B., et al.,** ***FOXP3 ensembles in T-cell regulation.*** **Immunol Rev, 2006. 212: p. 99-113.**

37. **McCarty, A.S., et al.,** ***Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily.*** **Mol Cell, 2003. 11(2): p. 459-70.**

38. **Ramsdell, F. and S.F. Ziegler,** ***Transcription factors in autoimmunity.*** **Curr Opin Immunol, 2003. 15(6): p. 718-24.**

39. **Li, S., J. Weidenfeld, and E.E. Morrisey,** ***Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions.*** **Mol Cell Biol, 2004. 24(2): p. 809-22.**

40. **Waterman, J.L., J.L. Shenk, and T.D. Halazonetis,** ***The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding.*** **Embo J, 1995. 14(3): p. 512-9.**

41. **Meyer, T., et al.,** ***A single residue modulates tyrosine dephosphorylation, oligomerization, and nuclear accumulation of stat transcription factors.*** **J Biol Chem, 2004. 279(18): p. 18998-9007.**

42. **Struhl, K.,** ***Transcriptional activation: mediator can act after preinitiation complex formation.*** **Mol Cell, 2005. 17(6): p. 752-4.**

43. **Wu, Y., et al.,** ***FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT.*** **Cell, 2006. 126(2): p. 375-87.**

44. **Lopes, J.E., et al., *Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor.* J Immunol, 2006. 177(5): p. 3133-42.**

45. **Marson, A., et al., *Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation.* Nature, 2007. 445(7130): p. 931-5.**

46. **Kretschmer, K., et al., *Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen.* Nat Immunol, 2005. 6(12): p. 1219-27.**

47. **Ono, M., et al., *Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1.* Nature, 2007. 446(7136): p. 685-9.**

48. **Li, B. and M.I. Greene, *FOXP3 actively represses transcription by recruiting the HAT/HDAC complex.* Cell Cycle, 2007. 6(12): p. 1432-6.**

49. **Lee, H.J., M. Chun, and K.V. Kandror, *Tip60 and HDAC7 interact with the endothelin receptor a and may be involved in downstream signaling.* J Biol Chem, 2001. 276(20): p. 16597-600.**

50. **Avni, O., et al., *T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes.* Nat Immunol, 2002. 3(7): p. 643-51.**

51. **Ida, K., et al., *Detection of chimeric mRNAs by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for diagnosis and monitoring of acute leukemias with 11q23 abnormalities.* Med Pediatr Oncol, 1997. 28(5): p. 325-32.**

52. **Setoguchi, R., et al., *Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization.* J Exp Med, 2005. 201(5): p. 723-35.**

53. **Wan, Y.Y. and R.A. Flavell, *Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression.* Nature, 2007. 445(7129): p. 766-70.**

54. **Zheng, Y., et al., *Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells.* Nature, 2007. 445(7130): p. 936-40.**

55. **Bettelli, E., M. Dastrange, and M. Oukka, *Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(14): p. 5138-43.**

56. **Smith, G.P. and V.A. Petrenko, *Phage Display.* Chem Rev, 1997. 97(2): p. 391-410.**

57. **Smith, G.P., *Filamentous phages as cloning vectors.* Biotechnology, 1988. 10: p. 61-83.**

58. **Di Niro, R., et al., *Characterizing monoclonal antibody epitopes by filtered gene fragment phage display.* Biochem J, 2005. 388(Pt 3): p. 889-94.**

59. **Cortese, R., et al., *Selection of biologically active peptides by phage display of random peptide libraries.* Curr Opin Biotechnol, 1996. 7(6): p. 616-21.**

60. **Folgori, A., et al., *A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera.* Embo J, 1994. 13(9): p. 2236-43.**

61. **Chen, Y.T., et al., *Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(12): p. 6919-23.**

62. **Clackson, T., et al., *Making antibody fragments using phage display libraries.* Nature, 1991. 352(6336): p. 624-8.**

63. **McCafferty, J., et al., *Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains.* Nature, 1990. 348(6301): p. 552-4.**

64. **Jespers, L.S., et al., *Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI.* Biotechnology (N Y), 1995. 13(4): p. 378-82.**

65. **Hufton, S.E., et al., *Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands.* J Immunol Methods, 1999. 231(1-2): p. 39-51.**

66. **Mueller, M., et al., *Identification of Borrelia burgdorferi ribosomal protein L25 by the phage surface display method and evaluation of the protein's value for serodiagnosis.* J Clin Microbiol, 2006. 44(10): p. 3778-80.**

67. **Waldo, G.S., et al., *Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein.* Nat Biotechnol, 1999. 17(7): p. 691-5.**

68. **Maxwell, K.L., et al., *A simple in vivo assay for increased protein solubility.* Protein Sci, 1999. 8(9): p. 1908-11.**

69. **Etz, H., et al., *Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from Staphylococcus aureus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(10): p. 6573-8.**

70. **Gerth, M.L., W.M. Patrick, and S. Lutz, *A second-generation system for unbiased reading frame selection.* Protein Eng Des Sel, 2004. 17(7): p. 595-602.**

71. **Faix, P.H., et al., *Phage display of cDNA libraries: enrichment of cDNA expression using open reading frame selection.* Biotechniques, 2004. 36(6): p. 1018-22, 1024, 1026-9.**

72. **Zacchi, P., et al., *Selecting open reading frames from DNA.* Genome Res, 2003. 13(5): p. 980-90.**

73. **Sblattero, D. and A. Bradbury, *A definitive set of oligonucleotide primers for amplifying human V regions.* Immunotechnology, 1998. 3(4): p. 271-8.**

74. **Sblattero, D. and A. Bradbury, *Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries.* Nat Biotechnol, 2000. 18(1): p. 75-80.**

75. **Di Niro, R., et al., *Construction of miniantibodies for the in vivo study of human autoimmune diseases in animal models.* BMC Biotechnol, 2007. 7: p. 46.**

76. **Zhulidov, P.A., et al., *Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease.* Nucleic Acids Res, 2004. 32(3): p. e37.**

77. **Hanke, T., P. Szawlowski, and R.E. Randall, *Construction of solid matrix-antibody-antigen complexes containing simian immunodeficiency virus p27 using tag-specific monoclonal antibody and tag-linked antigen.* J Gen Virol, 1992. 73 (Pt 3): p. 653-60.**

78. **Heit, J.J., *Calcineurin/NFAT signaling in the beta-cell: From diabetes to new therapeutics.* Bioessays, 2007. 29(10): p. 1011-21.**

79. **Walker, M.R., et al., *Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells.* J Clin Invest, 2003. 112(9): p. 1437-43.**

80. **Bacchetta, R., et al., *Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations.* J Clin Invest, 2006. 116(6): p. 1713-22.**

81. **McGinness, J.L., et al., *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) associated with pemphigoid nodularis: a case report and review of the literature.* J Am Acad Dermatol, 2006. 55(1): p. 143-8.**

82. **Lindvall, J.M., et al., *Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling.* Immunol Rev, 2005. 203: p. 200-15.**

83. **Macian, F., *NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function.* Nat Rev Immunol, 2005. 5(6): p. 472-84.**

84. **Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.**

Non so se da grande farò mai il ricercatore, ma devo comunque dire grazie a chi, per mezzo di questo Dottorato, mi ha dato la possibilità di vedere più a fondo la vita del laboratorio, con oneri ed onori, e di conoscere un po' di più il mondo di chi fa la "scienza-fantascienza" in maniera professionale.

Per cui più di un pensiero va al Professore Ventura, grazie a cui "ogni cosa è illuminata". Sempre pronto ad accogliere nuovi progetti, idee, suggerimenti letterari e ciclistici.
Un grazie al relatore di questa mia Tesi, il Dottore Alberto Tommasini, che ha, forse sopravvalutandomi, creduto nelle mie capacità, dandomi enorme libertà di fare ed agire…forse non sono riuscito a sfruttare al meglio questo eccesso di libertà cadutomi addosso improvvisamente, ma mi è servito per "farmi le ossa".
Un grazie al Dottor Tarcisio Not, fonte inesauribile di aneddoti, curiosità scientifiche, scambi culturali…insomma un calderone di "cose buone e giuste".
Inoltre un sentito ringraziamento a tutti coloro che ho disturbato per le loro competenze scientifiche: dal Professor Roberto Marzari, al Professore Daniele Sblattero, il "semprecapo", alla dottoressa Fiorella Florian.

Sono poi necessari, e più che meritati, i ringraziamenti a tutti coloro che ho incontrato nel mio lavoro quotidiano, che spesso hanno dovuto sopportare questo mio caratterino…San-Alessandra-Pontillo-Martire, Annalisa, la neo-mamma, Luigina, Sara "la quaglia del malagurio", Michela, Sara "davittorio", Fabiana, Serena, Nicola…per non dimenticare poi lo "staff" del Laboratorio di Biologia: Sabrina, il Tiz (spacciatore di vettori e di "zoghetti")…e tutti "quelli" dell'Ospedale…
Se mi sono dimenticato di qualcuno la colpa è esclusivamente mia…

Tutto questo non sarebbe stato minimamente possibile senza il sempre presente e puntale appoggio della mia famiglia. Dai nonni, che mi continuano a stupire per come siano fonte di saggezza infinita, a mia sorella, che mi dovrà mantenere quando sarà donna in carriera.
Poi ci sono i miei genitori…Non so scrivere abbastanza bene per poterli ringraziare in maniera adeguata. Al di là della pazienza immensa per questo "bambocione", mia madre è sicuramente una delle colonne portanti della mia vita, mio padre è colui che mi ha dato la scintilla…e che adesso deve subirne le conseguenze!

Poi c'è Sara…il mio Tarallo…senza di lei la vita non avrebbe lo stesso sapore.