

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

Biotechnologie dello Sviluppo e
della Riproduzione

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare: BIO17

Studio del *pathway* della Displasia
Ectodermica Anidrotica (EDA)

Presentata da: **Dott.ssa Diana Esibizione**

Coordinatore Dottorato

Prof.ssa Elisabetta Caramelli

Relatore

Prof. Furio Pezzetti

Esame finale anno 2008

INDICE

Introduzione

- 1. Displasie Ectodermiche: classificazione e segni clinici** p. 5
- 2. Displasia Ectodermica Anidrotica/Ipoidrotica (EDA/HED):
Eziologia e frequenza** p. 7
- 3. Pathway molecolare dell'EDA** p. 10
- 4. Modelli animali EDA** p. 13
- 5. Isoforme alternative di EDA/recettori e topi transgenici EDA** p. 15
- 6. EDA signaling nello sviluppo di annessi ectodermici** p. 18
- 7. Regolatori ed effettori del pathway EDA** p. 24
- 8. Displasia Ectodermica Anidrotica con Immunodeficienza
X-linked (XL-EDA-ID)** p. 28

Scopo del lavoro p. 35

3. Materiali e Metodi

Progetto: "Analisi di espressione di geni candidati target del pathway di EDA in cheratinociti primari di topo Wild-type e Tabby" p. 39

4. Materiali e Metodi

Progetto: "Studio del gene Nemo nella Displasia Ectodermica Anidrotica con Immunodeficienza (EDA-ID)" p. 44

5. Risultati

Progetto: "Analisi di espressione di geni candidati target del pathway di EDA in cheratinociti primari di topo Wild-type e Tabby"

- 5.1. Analisi genotipica delle linee cellulari** p. 55
- 5.2. Analisi del profilo di espressione mediante microarrays** p. 55
- 5.3. Conferma del profilo di espressione in cheratinociti
tramite Q-PCR** p. 59
- 5.4. Analisi mediante Western blotting** p. 60
- 5.5. Analisi del profilo di espressione di geni selezionati su
campioni di pelle totali Wild-type e Tabby tramite Q-PCR** p. 63

6. Risultati

Progetto: "Studio del gene Nemo nella Displasia

Ectodermica Anirotica con Immunodeficienza (EDA-ID)"

6.1. Preparazione ed analisi del costrutto PT-K17-Nemo

Wild-type e mutato

p. 74

6.2. Saggi di attivazione del fattore NF-Kb mediante

Luciferasi

p. 77

6.3. Preparazione del topo transgenico ed analisi genotipica **p. 79**

Discussione

p. 83

Bibliografia

p. 93

Sintesi attività di ricerca (Italiano)

p.102

Sintesi attività di ricerca (Inglese)

p.107

Introduzione

1.1. Displasie Ectodermiche: classificazione e segni clinici

Le Displasie Ectodermiche rappresentano un vasto e complesso gruppo nosologico di patologie (Priolo et al., 2000) che influenza la morfogenesi di due o più strutture originate dall'ectoderma (OMIM_34500), lo strato cellulare esterno di un embrione in via di sviluppo (Kupietzky et al., 1995).

Storicamente i primi dati relativi alla displasia ectodermica risalgono al 1875 quando Charles Darwin riportò nel suo libro "*The variation of animals and plants under domestication*", i fenotipi degli annessi epidermici ereditati in modo sesso-specifico dagli uomini di una famiglia di Indiani affetti (Cui e Schlessinger, 2006).

Nel corso degli anni, più di 190 differenti condizioni cliniche patologiche sono state riconosciute e definite Displasie Ectodermiche (Freire-Maia et al., 2001). Tali condizioni hanno in comune anomalie a carico di capelli, unghie e ghiandole sudoripare ed in molti casi si riscontrano alterazioni in altri organi e sistemi e ritardo mentale (Priolo et al., 2000; Itin e Fistarol, 2004).

La frequenza delle displasie ectodermiche nella popolazione generale è 7:10.000 nati e sono riportati numerosi segni e sintomi tipici (Itin e Fistarol, 2004). Come riportato in Priolo et al., 2000 e Kupietzky e Houpt, 1995, le forme più sindromiche delle displasie ectodermiche si identificano tramite peculiari alterazioni a carico di strutture di derivazione ectodermica. L'epidermide è secca, sottile ed ipopigmentata con ipercheratosi ed eczemi ed i neonati affetti possono presentare desquamazione della pelle. La fronte è pronunciata, le labbra sono spesse, gonfie e sporgenti ed i capelli generalmente biondi con frequenti ipotricosi e segni di alopecia totale o parziale in quanto, i

follicoli piliferi del corpo sono solitamente in numero ridotto o assenti. Le unghie possono essere distrofiche, ipertrofiche con difetti di cheratinizzazione, scolorite e frammentate. I denti possono essere pochi (oligodontia) e con forma rudimentale conica o assenti del tutto (anodontia). Le ghiandole sudoripare sono ipoplastiche o plastiche causando intolleranza al calore e frequente febbre alta, inoltre, le ghiandole della mucosa orale e nasale, ghiandola salivare e ghiandola mammaria possono essere ipotrofiche o assenti. L'assenza di ghiandole mucose nel tratto respiratorio e gastrointestinale può provocare frequenti infezioni a carico dei tratti interessati.

Altri segni clinici associati possono includere disturbi nasali, rinite atrofica, faringite cronica, episodi ricorrenti di asma, epistassi, perdita di udito dovuta ad accumulo di cerume nel canale uditivo e diminuzione di fluidi corporei, tra cui la saliva. Talvolta si verificano episodi di ritardo mentale che ricorrono in seguito a fenomeni di ipertermia ma lo sviluppo mentale generalmente avviene normalmente (Kupietzky e Houpt, 1995).

Una prima ampia classificazione delle Displasie Ectodermiche si basa, dunque, sulla loro descrizione clinica. Freire-Maya e Pinheiro proposero due gruppi principali, A e B (Itin et al., 2004; Pinheiro e Freire-Maya, 1994). Al gruppo A appartengono le condizioni con difetti in almeno due delle classiche strutture ectodermiche quali capelli, unghie, denti e ghiandole sudoripare, con o senza malformazioni o altri difetti; nel gruppo B rientrano le condizioni con difetti in solo uno dei quattro annessi menzionati con anomalie a carico di orecchie, labbra, e palmi di mani e piedi (Priolo et al., 2000). In seguito Priolo e Lagana, valutando i meccanismi biologici alla base della patogenesi delle

Displasie Ectodermiche, hanno elaborato due gruppi di appartenenza: il gruppo 1, rappresenta difetti della regolazione nello sviluppo e nelle interazioni tra epitelio e mesenchima; il gruppo 2 include patologie con anomalie a carico del citoscheletro e di stabilità cellulare (Priolo et al., 2001).

Infine, Lamartine, ha proposto una promettente classificazione basata su criteri molecolari e biochimici, individuando quattro sottogruppi principali: segnalazione ed interazione cellula-cellula, adesione cellulare, regolazione trascrizionale e sviluppo (Lamartine, 2003).

Tra le numerose forme di Displasia Ectodermica, sono riportate in letteratura la sindrome di Ellis-Van Creveld (OMIM_225500), l'Incontinentia Pigmenti (OMIM_308300) e la displasia ectodermica Rapp-Hodgkin (OMIM_129400) (Kupietzky et al., 1995). La displasia ectodermica ipoidrotica, nota anche come sindrome di Christ-Siemens-Touraine o displasia ectodermica anidrotica (OMIM_305100) rappresenta la forma più comune (Arnold et al., 1984; Kupietzky et al., 1995; Priolo et al., 2000), con alterazioni in follicoli piliferi, denti e ghiandole sudoripare nei pazienti umani e nei modelli animali (Cui e Schlessinger, 2006).

1.2. Displasia Ectodermica Anidrotica/Ipoidrotica (EDA/HED):

Eziologia e frequenza

La Displasia Ectodermica Anidrotica, con frequenza nella popolazione 1:100.000, (van der Hout et al., 2008) influenza lo sviluppo di ghiandole sudoripare, follicoli piliferi e denti (Cui e Schlessinger, 2006). I principali segni clinici dei soggetti affetti includono atricosi o ipotricosi, anodontia o ipodontia ed anidrosi o

ipoidrosi (Figura 1a/b). La ridotta capacità di sudare può causare grave ipertermia e letalità se la patologia non è diagnosticata (Mikkola e Thesleff, 2003) nei primi anni di vita. Tale sindrome è causata da mutazioni in qualsiasi membro del *pathway* molecolare che include la molecola Ectodisplasina (EDA, OMIM_224900), il suo recettore EDAR (EDA receptor, OMIM_604095) e la proteina adattatrice EDARADD (*adapter EDAR associated protein*, OMIM_606603) (Kere et al., 1996; Headon and Overbeek, 1999; Headon et al., 2001) che rappresentano una nuova famiglia ligando/recettore/adattatore TNF (*tumor necrosis factor*), coinvolta nello sviluppo di annessi epidermici (Cui e Schlessinger, 2006).

Questa forma di Displasia Ectodermica può essere trasmessa come tratto recessivo legato al cromosoma X (Kupietzky e Houpt, 1995), autosomico dominante ed autosomico recessivo (Priolo et al., 2000). In particolare, il gene coinvolto nella forma recessiva X-linked, *Ectodisplasina (EDA)*, localizzato nella regione cromosomica Xq13.1, risulta mutato nel 75-95 % di casi familiari e nel 50 % di casi sporadici (Chassaing et al., 2006). In questa particolare forma, le madri portatrici presentano forme di ipodontia e/o denti conici ed una riduzione della sudorazione (Figura 1c). Le madri non affette hanno il 50% di probabilità di trasmettere il disordine al figlio maschio ed ogni figlia femmina ha il 50% di probabilità di ereditare il gene mutato diventando portatrici (Kupietzky e Houpt, 1995). La forma autosomica recessiva e dominante si presenta nel 25% dei casi ed è caratterizzata da mutazioni nel gene codificante il recettore di EDA, *EDAR* (Chassaing et al., 2006; van der Hout et al., 2008) localizzato in 2q13. Il gene EDARADD, localizzato in 1q43, invece, risulta mutato nella forma

autosomica recessiva e, recentemente, e' stata individuata una nuova famiglia con una mutazione nel gene *EDARADD* che causa Displasia Ectodermica Anidrotica a trasmissione dominante autosomica (Bal et al., 2007).

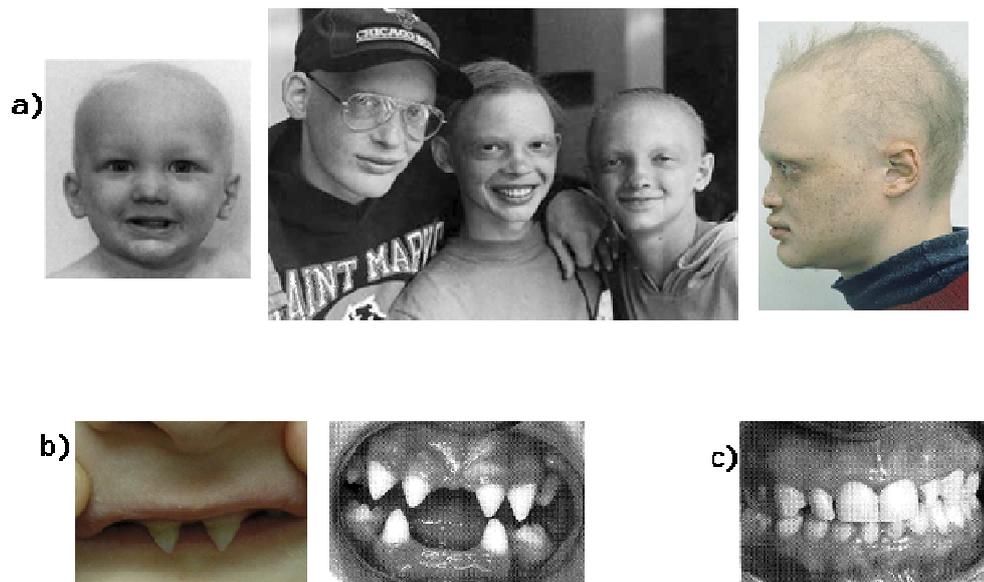


Figura 1: Caratteristiche fenotipiche di pazienti EDA. a) I pazienti presentano una fronte pronunciata, sopracciglia assenti, atricosi o ipotricosi con capelli sottili, pelle secca e pelle rugosa sotto gli occhi. **b)** L'analisi della dentatura rivela la mancanza di vari denti e la presenza di pochi denti conici. **c)** La madre di un paziente EDA, probabile portatore della patologia, presenta alcuni denti di struttura conica. (Mikkola e Thesleff, 2003; Kere et al., 1996; Chang et al., 2008; Kupietzky e Houpt, 1995).

1.3. Pathway molecolare dell'EDA

Il gene *EDA* codifica una proteina di tipo II transmembrana appartenente alla famiglia dei ligandi TNF in quanto possiede un breve segmento di collagene ed un dominio TNF nella sua regione extracellulare (Figura 2) (Cui e Schlessinger, 2006).

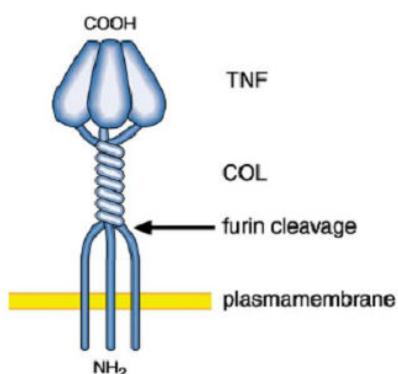


Figura 2: Rappresentazione schematica della proteina Ectodisplasina. Sono indicati il dominio transmembrana, il sito di taglio furinico, il segmento di collagene e la regione di omologia con fattori della famiglia TNF. (Mikkola e Thesleff, 2003).

La presenza di un sito di taglio furinico vicino al dominio di collagene permette il rilascio della proteina EDA solubile che, dunque, trimerizza formando un ligando attivo (Cui e Schlessinger, 2006; Elomaa et al., 2001). Mutazioni missenso o delezioni nella cornice di lettura che causano la sindrome EDA, sono state identificate a carico dei domini TNF, collagene, taglio furinico e transmembrana del gene *EDA* (Cui e Schlessinger, 2006; Schneider et al., 2001). Mutazioni in pazienti a carico del dominio collagene indicano che tale regione svolge un ruolo importante ma ancora poco chiaro. Sembra, infatti, che tale dominio contribuisca alla stabilità del trimero nonostante manchi di residui di lisina, amminoacido comunemente presente in trimeri di collagene (Cui e Schlessinger, 2006; Elomaa et al., 2001). Trimeri di EDA legano, dunque, il recettore EDAR, proteina transmembrana di tipo I, membro

della famiglia dei recettori di TNF, dotato, infatti, di un dominio TNFR extracellulare ed un dominio di morte cellulare (*Death domain*, DD) intracellulare (Cui e Schlessinger, 2006; Headon e Overbeeck, 1999). Nonostante la presenza del *death domain*, è molto discussa la capacità di EDAR di indurre morte cellulare, a differenza di altri membri TNFR dotati dello stesso dominio (TNFR1, NGFR, DR3,4,5,6) (Cui e Schlessinger, 2006; Koppinen et al., 2001). Tale regione DD di EDAR è responsabile del suo legame con la proteina adattatrice EDARADD che contiene a sua volta un dominio DD. EDARADD può dunque, legare il complesso TRAF6/TAK1/TAB2 ed attivare il complesso IKK del *pathway* canonico di NF- κ B (Marlon et al., 2005; Hayden e Ghosh, 2004) (Figura 3), fattore nucleare implicato principalmente nell'attività del sistema immunitario ma anche nello sviluppo di cellule B e T e di vari sistemi quali ossa, epidermide e Sistema Nervoso Centrale, produzione di citochine, fattori di crescita ed enzimi (Figura 3) (Ghosh e Karin, 2002; Courtois e Smahi, 2006; Nelson, 2006). I fattori NF- κ Bs sono costituiti dalla associazione di omo- o eterodimeri di proteine della famiglia RelA/NF- κ B. Questa famiglia, molto conservata a livello evolutivo, è composta da 5 subunità: RelA (p65), p50, c-Rel, RelB e p52 (Hayden e Ghosh, 2004; Cui e Schlessinger, 2006; Courtois e Smahi, 2006). Tali proteine partecipano a crescita e differenziamento dei cheratinociti, essendo, per questo, coinvolte in vari disordini come psoriasi, cancro della pelle e malattie infiammatorie cutanee (Cui e Schlessinger, 2006).

Il complesso IKK è costituito da due subunità catalitiche, IKK α (IKK1) ed IKK β (IKK2) ed una subunità regolatoria IKK γ definita anche NEMO (*NF- κ B essential modulator*, OMIM_300248) (Hayden e Ghosh, 2004;

Courtois, 2005). L'interazione EDA/EDAR/EDARADD porta all'attivazione di complesso IKK che fosforila le proteine del complesso I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ) a livello di residui di serina e liberano il fattore NF- κ B che migra nel citoplasma per attivare geni *target* (Figura 3). In assenza di stimolo, le proteine I κ Bs mantengono il fattore NF- κ B in forma inattiva all'interno del citoplasma cellulare inibendo l'attivazione di geni effettori (Courtois e Smahi, 2006; Cui e Schlessinger, 2006).

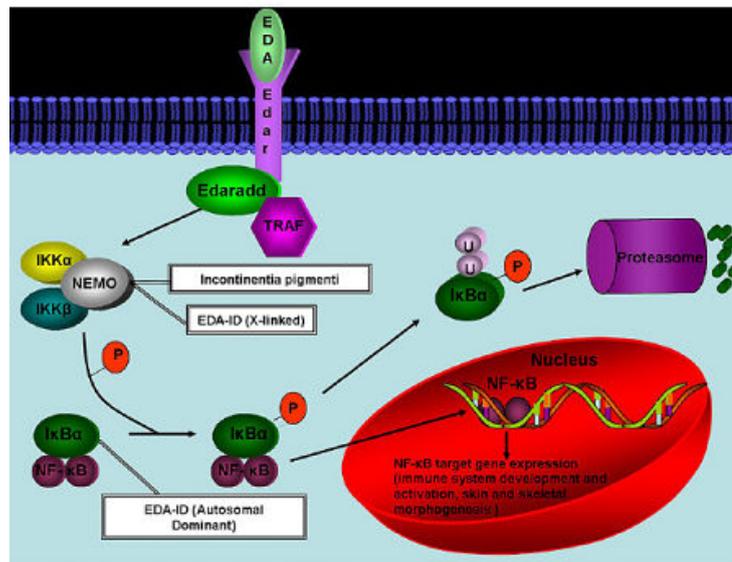


Figura 3: Pathway EDA/NF- κ B. Il legame di EDA al recettore EDAR determina la formazione di un complesso con EDARADD e TRAF6. Ciò porta all'attivazione del complesso IKK (IKK α , IKK β e NEMO) per la fosforilazione delle proteine I κ B α che vengono ubiquitinate e degradate liberando NF- κ B che migra, così, nel nucleo dove attiva vari geni *target*. Sono inoltre indicate le genodermatosi umane causate da mutazioni in alcuni geni del *pathway* (riquadri bianchi). (Chang et al., 2008).

Altri membri della famiglia TNF come LT β e BAFF possono attivare il *pathway* di NF- κ B (*pathway* alternativo) in modo NEMO-indipendente. In tal caso, mediante la chinasi NIK [(NF- κ B inducing kinase, membro di famiglia MAP3K)], viene attivato direttamente IKK α , che fosforila p100 (precursore di p52) generando p52 ed il dimero p52-RelB (Figura 4) (Ghosh e Karin, 2002; Courtois, 2005; Cui et al., 2006; Saitho et al., 2002).

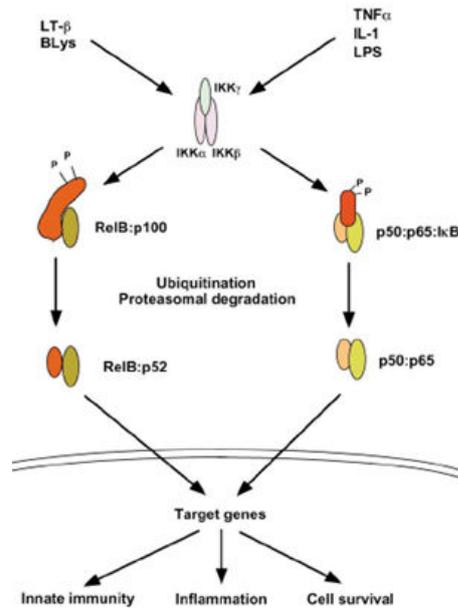


Figura 4: Pathway NF- κ B canonico ed alternativo. Il *pathway* indicato sulla destra mostra la classica via di attivazione di NF- κ B tramite attivazione del complesso IKK e fosforilazione di proteine I κ Bs. Il *pathway* indicato sulla sinistra mostra la via alternativa in cui la diretta attivazione di IKK γ determina fosforilazione e processamento di p100 generando gli eterodimeri p52-RelB. (Ghosh e Karin, 2002).

Il *pathway* EDA/EDAR/NF- κ B è esclusivamente coinvolto nella patologia EDA e, alterazioni in alcuni geni cruciali del *pathway* (*NEMO*, *NF- κ B* ed *I κ B*) possono determinare fenotipo EDA associato ad Immunodeficienza (Cui e Schlessinger, 2006; Zonana et al., 2000; Fusco et al., 2008; Chang et al., 2008; Courtois et al., 2003).

1.4. Modelli animali EDA

I geni *EDA*, *EDAR* e *EDARADD* sono stati molto conservati durante l'evoluzione, pertanto, sono presenti modelli di studio tra i vertebrati quali topo, pesce, xenopus, gallina, cane, vitello e scimpanzè. Mutanti spontanei nei corrispondenti modelli animali per geni del *pathway* EDA sono stati ritrovati per cane e vitello, con mutazioni a carico del gene *Eda* e pesce medaka, con mutazioni a

carico del gene *Edar* che determinano una diminuzione nel numero di scaglie. I modelli murini per la patologia EDA sono stati isolati già da molti anni e sono caratterizzati da mutazioni spontanee nei geni *Tabby*, *Downless* e *Crinkled*, rispettivamente omologhi ai geni *EDA*, *EDAR* e *EDARADD* (Cui e Schlessinger, 2006). I topi mutanti mostrano, infatti, lo stesso fenotipo a carico di derivati ectodermici, con mancanza di denti o alterazioni nella loro forma, assenza di ghiandole sudoripare (comunemente presenti nel palmo delle zampe) e due dei tre tipi di peli, *Guard*, *Zigzag* e *Awl*, sostituiti da peli intermedi denominati *Awl-like* o *Medium* con un'anormale organizzazione delle cellule della medulla pilifera. Inoltre, non presentano peli sulla coda e presentano una caratteristica zona di alopecia dietro le orecchie (Figura 5a). Altre ghiandole come quella lacrimale, del Meibomio e submandibolare risultano assenti o di dimensioni ridotte (Fessing et al., 2006; Cui e Schlessinger, 2006; Cui et al., 2003; Mikkola e Thesleff, 2003). Alterazioni fenotipiche identiche ai modelli *Tabby*, *Downless* e *Crinkled* sono, inoltre, presenti anche nei modelli animali *Traf6*^{-/-}. Tali mutanti presentano, infatti, difetti nei follicoli piliferi con presenza di zone di alopecia ed alterazioni in ghiandole sudoripare, sebacee, del Meibomio, anali e prepuziali (Naito et al., 2002). Aberrazioni a carico di altri tessuti di origine ectodermica quali lesioni della cornea ed infiammazioni della congiuntiva oculare sono state riportate, inoltre, sia in pazienti umani che in modelli murini (Figura 5a). Nel modello murino, infatti, è assente la ghiandola del Meibomio (deputata alla produzione della fase lipidica presente nelle lacrime per limitarne l'evaporazione), mentre nei pazienti EDA umani presenta alterazioni (Cui et al., 2005).

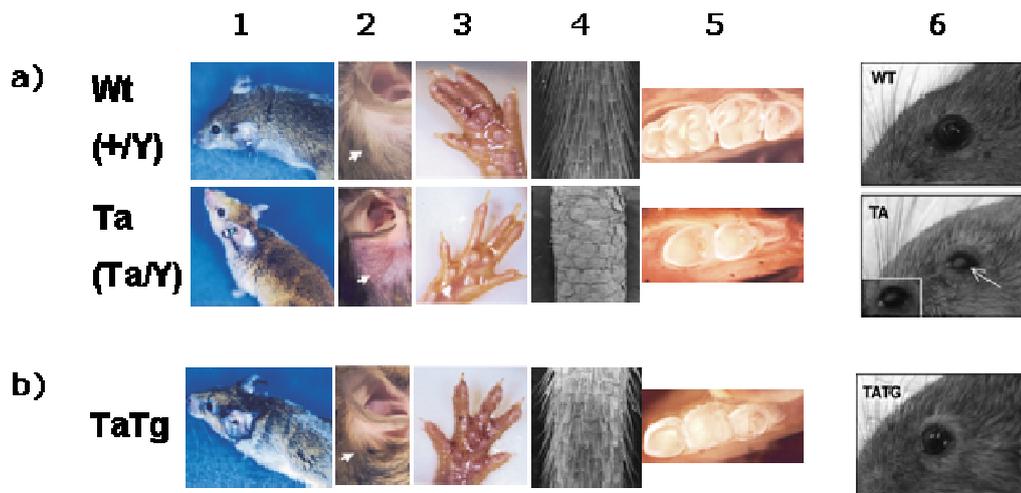


Figura 5: Fenotipo di modelli murini Tabby. a) 1, animali maschi Wt (+/Y) hanno uno spesso mantello color marrone, mentre, i maschi Ta (Ta/Y) hanno un mantello più sottile di colore più chiaro; 2, i campioni Ta presentano la caratteristica zona di alopecia dietro le orecchie; 3, test allo iodio sul palmo delle zampe mostra l'assenza in topi Ta di ghiandole sudoripare che invece sono visibili come punti di colore nero nel Wt; 4, l'analisi al microscopio elettronico di campioni di coda rivela l'assenza completa di pelo nel campione Ta rispetto al Wt; 5, numero e dimensioni ridotte nei molari del campione Ta; 6, in Ta sono visibili ispessimenti ai margini dell'occhio e mancano alcuni peli intorno alle sopracciglia, la freccia indica opacità corneale e presenza di muco. **b)** La presenza del transgene EDA-A1 (TaTg) determina il ripristino di spessore e colore del mantello (1), della zona di alopecia dietro le orecchie (2), delle ghiandole sudoripare (3), del numero di follicoli piliferi della coda (4) e, del numero di molari sebbene le dimensioni siano ridotte. Inoltre, EDA-A1 ripristina totalmente il fenotipo oculare del topo Tabby. (Srivastava et al., 2001; Cui et al., 2005).

1.5. Isoforme alternative di EDA/recettori e topi transgenici

EDA

Il gene *EDA* produce diverse varianti di *splicing* e, recentemente, sono state identificate 9 isoforme *Eda-A* in cheratinociti murini (Hashimoto et al., 2006). Le due isoforme funzionali, *Eda-A1* e *Eda-A2*, predominano rappresentando l'80% del totale (Cui e Schlessinger, 2006) e, pur differendo fra loro per soli due amminoacidi, sono in grado di legare due recettori diversi, *EDAR* e *XEDAR* rispettivamente

(Mustonem et al., 2003). L'interazione EDA-A1/EDAR dimostra l'attivazione del fattore NF-kB *in vitro*, tramite l'adattatore EDARADD ed il legame con TRAF6. Anche il complesso EDA-A2/XEDAR, mediante diretta interazione con TRAF6, attiva NF-kB *in vitro*, mentre, tale risultato è ancora discusso per i risultati *in vivo* (Cui e Schlessinger, 2006; Schmidt-Ulrich et al., 2006; Mikkola e Thesleff, 2003). Anche le nuove forme EDA-A5 ed A5', che legano rispettivamente EDAR e XEDAR, sono riportate come attivatori di NF-kB *in vitro* (Cui e Schlessinger, 2006).

Il modello murino transgenico Tabby con over-espressione di *Eda-A1* ma non di *Eda-A2* presenta miglioramenti fenotipici a carico dei vari organi di origine ectodermica suggerendo, per la forma A1, un ruolo nei processi di inizio, morfogenesi e differenziamento degli organi ectodermici (Mustonen et al., 2003; Cui et al., 2003).

Modelli murini Tabby transgenici per la presenza della forma *Eda-A1* sotto il controllo di diversi promotori [CMV, K14, condizionali Tet (MMTV) ed Involucrina, per la sequenza cDNA completa di EDA-A1; K5 e catena leggera della miosina (MLCH), per la parte solubile di EDA-A1] (Fessing et al., 2006) in modo da over-esprimere *Eda-A1* a livelli paragonabili all'endogeno (Srivastava et al., 2001) o 100 volte più elevati (Cui et al., 2003; Cui et al., 2005), sono stati studiati per valutare il ripristino del fenotipo Wild-type.

La forma EDA-A1 ripristina peli di tipo *Guard* e ghiandole sudoripare (Fessing et al., 2006) anche a bassi livelli (Cui et al., 2008); i denti sono ripristinati parzialmente; le ghiandole del prepuzio e del Meibomio non vengono ripristinate; i difetti a carico della cornea ed infiammazioni della congiuntiva oculare non sono presenti (Srivastava

et al., 2001; Cui et al., 2003; Cui e Schlessinger, 2006) (Figura 5b); i peli di tipo *Zigzag* ed *Awl* sembravano non essere ripristinati in base a lavori precedenti (Cui et al., 2003) ma una successiva e più dettagliata analisi del transgenico ad alti livelli di *Eda-A1* rivela la presenza di una riconoscibile forma di tali peli. Dunque, la forma *Eda-A1* da sola è da ritenersi sufficiente al ripristino dei vari sottotipi di pelo anche se questi possono risultare leggermente anormali (Cui et al., 2008). L'over-espressione di *EDA-A1* in topi Wild-type, invece, reprime la formazione dei peli *Zigzag* (Cui e Schlessinger, 2006) ed *Auchene*, mentre i peli *Guard* ed *Awl* risultano uguali al Wild-type (Cui et al., 2008).

Così come l'over-espressione di *Eda-A1*, l'utilizzo della proteina ricombinante *EDA-A1 Fc* (legata alla porzione Fc di IgG1), determina il recupero degli annessi epidermici quando iniettata per via intravenosa in topi Tabby incinte, suggerendo, dunque un possibile impiego clinico della metodologia (Gaide et al., 2003; Cui e Schlessinger, 2006; Fessing et al., 2006).

In base a tali risultati, la forma *EDA-A1* non può ricostituire totalmente il fenotipo Wild-type, pertanto, risulta verosimile che le altre isoforme di *EDA* esistenti possano avere un ruolo chiave nello sviluppo di derivati ectodermici tramite *pathways* di segnalazione alternativi. Inoltre, il modello murino *knockout* per il gene *Xedar*, non presenta alterazioni fenotipiche a carico degli annessi epidermici, pertanto, si ritiene non sia necessario ad un loro corretto sviluppo (Fessing et al., 2006; Cui e Schlessinger, 2006; Hashimoto et al., 2008).

Un altro recettore di recente scoperta, *TROY*, membro della famiglia *TNFR*, risulta molto simile, per struttura e localizzazione

nell'epidermide, ai recettori EDAR e XEDAR (Hashimoto et al., 2006). TROY risulta molto espresso anche in altri tessuti, infatti, nel sistema nervoso periferico agisce da co-recettore di NgR1 (recettore 1 Nogo-66) nella formazione di un complesso TROY/NgR1/LINGO1 che reprime la rigenerazione assonica (Shao et al., 2005), mentre, nel mesoderma somitico, regola la somitogenesi a valle del *pathway* di segnalazione *Wnt* (Hashimoto et al., 2008). TROY lega debolmente l'isoforma EDA-A5' e tale interazione necessita di fattori addizionali per essere stabile (Hashimoto et al., 2006; Hashimoto et al., 2008). Il ligando, recentemente identificato, di tale recettore è $LT\alpha$ coinvolto nel sistema immunitario, con un possibile ruolo nella mediazione della risposta infiammatoria e, principalmente espresso nel tessuto linfonodale, infatti, topi $LT\alpha^{-/-}$ (ma non topi $Troy^{-/-}$) presentano alterazioni a carico del sistema immunitario. Il legame TROY/ $LT\alpha$ consente l'attivazione del *pathway* NF- κ B, pertanto, TROY potrebbe essere coinvolto nello sviluppo degli annessi epidermici, nonostante i modelli murini $Troy^{-/-}$ presentino annessi epidermici normali. Dunque, TROY/ $LT\alpha$ potrebbe rappresentare un secondo sistema di segnalazione nella pelle la cui mancanza viene compensata da ulteriori meccanismi (Hashimoto et al., 2008).

1.6. EDA signaling nello sviluppo di annessi ectodermici

La caratteristica principale delle Displasie Ectodermiche sono le alterazioni a carico degli annessi ectodermici (Itin e Fistarol, 2004), il cui sviluppo embrionale deriva dalle interazioni tra l'epitelio ed il mesenchima (Drogemuller et al., 2003; Cui et al., 2008). Lo sviluppo degli annessi ectodermici ha inizio con un locale ispessimento epiteliale

detto placca ectodermica. La formazione della placca ectodermica è accompagnata da condensazione delle cellule mesenchimali sottostanti volte a formare una papilla che protrude all'interno o all'esterno del mesenchima (Pispa e Thesleff, 2003; Pummila et al., 2007). Successive modifiche morfologiche delle componenti epiteliali e mesenchimali risulteranno nella forma e nella dimensione finale dell'organo (Figura 6) (Pispa e Thesleff, 2003).

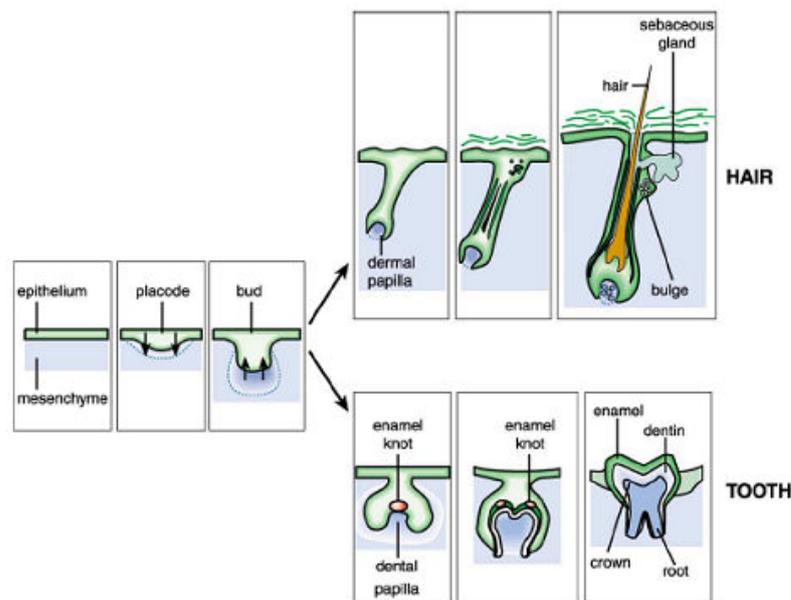


Figura 6: Caratteristico sviluppo di annessi ectodermici come peli e denti. Entrambi gli organi derivano dall'epitelio di superficie ed il sottostante mesenchima ed il loro sviluppo è regolato da interazioni tra questi due tessuti. I primi stadi prevedono formazione di placca (*placode*) e di una gemma (*bud*) che protrude all'interno o all'esterno del mesenchima con formazione di una papilla dentale o dermica. Durante la morfogenesi il mesenchima dirige la strutturazione dell'epitelio determinando la forma finale dell'organo. (Mikkola e Thesleff, 2003)

Durante tali processi, varie molecole di segnale (e loro inibitori) (Pummila et al., 2007) partecipano all'iniziazione, crescita e seguente morfogenesi della placca (Schmidt-Ullrich et al., 2005) tra cui molecole coinvolte in interazioni cellula-cellula durante l'embriogenesi (*Wnts*, con gli effettori *β -catenin* e *LEF1*), proteine della morfogenesi ossea (*BMPs*) e fattori di crescita fibroblastici (*FGFs*) (Mustonen et al., 2003; Pummila et al., 2007; Pispas e Thesleff, 2003) coinvolti nei primi segnali mesenchimali per l'induzione di annessi epidermici (Cui et al., 2008) e, il gene *Sonic Hedgehog (Shh)*, del gruppo di geni *Homeobox* coinvolto nel secondo ciclo di segnali epiteliali per la progressione e formazione dell'organo (Cui et al., 2008). WNTs ed FGFs sono noti promotori della formazione della placca mentre le proteine BMPs della famiglia TGF- β sono generalmente definiti come inibitori di tale processo (Pummila et al., 2007). Tali famiglie di geni sono espresse a diversi stadi di organogenesi ectodermica ed i geni *target* che regolano sono spesso gli stessi nei diversi organi di origine ectodermica (Pispas e Thesleff, 2003).

Questi geni favoriscono la trasmissione e l'interazione reciproca induttiva che avviene tra le due strutture, operando come morfogeni a stadi molto precoci della vita embrionale, in uno spazio temporale di espressione molto preciso (Priolo et al., 2000).

Le molecole EDA, EDAR ed EDARADD sono espresse durante lo sviluppo di denti e capelli a livello epiteliale prima della formazione della placca, a livello della placca stessa ed, infine, durante la morfogenesi ed il processo di differenziamento (Cui et al., 2002). La precisa sequenza temporale del meccanismo di azione di EDA/EDAR non è ancora del tutto chiara, ma tali geni risultano espressi in modo

diverso durante la formazione della placca nei vari stadi embrionali. In particolare, dapprima l'espressione di *Eda* ed *Edar* è sovrapposta nel sottile strato ectodermico che ricopre l'embrione (E11-E13) ma, in seguito alla formazione della placca (da E14), *Edar* risulta espresso a livello della placca (Pispa e Thesleff, 2003; Headon e Overbeek, 1999) mentre *Eda* è presente nella regione ectodermica interplacca e solo post-nascita (P0) assumono una espressione co-localizzata a livello dei bulbi pilifero e dentale (Cui et al., 2002; Laurikkala et al., 2002). Analisi dimostrano che solo l'isoforma EDA-A1 segue questo *pattern* di espressione in quanto la forma EDA-A2 viene monitorata solo dallo stadio E17 in poi, suggerendo, dunque, un ruolo predominante del *signaling* di EDAR nella formazione della placca ma non di XEDAR, che potrebbe agire maggiormente negli stadi di differenziamento (Mikkola e Thesleff, 2003).

Durante i processi di formazione della placca, le interazioni epitelio mesenchima hanno un ruolo non ancora ben definito e, come proposto da Laurikkola et al., 2002, l'espressione di *Eda* è indotta da WNT/LEF1, mentre, l'espressione di *Edar* è indotta da Attivina A prodotta dal mesenchima sottostante. Una volta prodotta nelle regioni interplacca, EDA, è secreta dalle cellule e in forma trimerica raggiunge ed attiva EDAR (Figura 7) (Laurikkola et al., 2002).

Inoltre, i modelli murini nulli per *Edar* ed *Eda* mancano delle prime placche per la formazione dei peli e presentano alterazioni a carico dei denti, indicando il necessario ruolo del *pathway* EDA sia nei primi stadi di formazione della placca sia negli stadi più tardivi dello sviluppo degli organi. L'over-espressione di *Ectodisplasia* è, invece, associata alla comparsa di placche per denti e ghiandole mammarie

sovranumerarie, crescita di peli e unghie ed aumentata attività di ghiandole sudoripare (Pummila et al., 2007; Pispas e Thesleff, 2003).

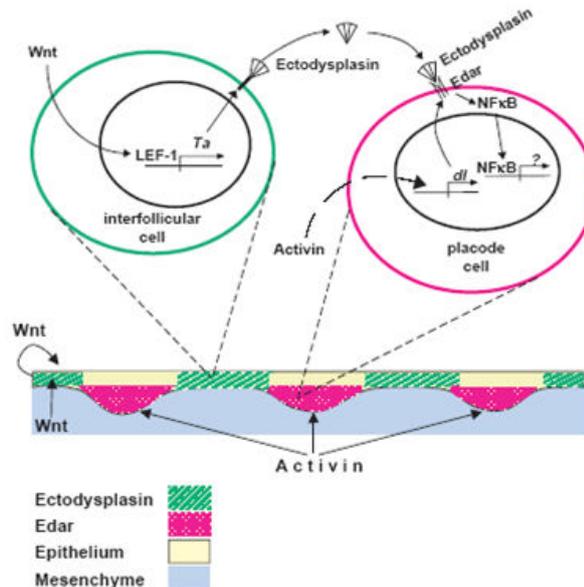


Figura 7: Modello di regolazione EDA/EDAR durante la formazione della placca. EDA (Ta) è espresso nella regione ectodermica interfollicolare ed è indotta da segnali WNT/LEF1. EDAR (dl) è espresso a livello della placca e stimolato da segnali di Attivina A provenienti dal mesenchima sottostante. EDA è secreta dalle cellule e come trimero raggiunge e lega EDAR attivando NF-kB. (Laurikkola et al., 2002)

Come riportato in Cui et al., 2008, il *pathway* EDA influenza lo sviluppo di ghiandole sudoripare e follicoli piliferi agendo durante la progressione, ma non la maturazione, in specifici stadi embrionali e, soprattutto, sembra avere un ruolo nella determinazione del sottotipo di pelo. In topi Wild-type, i vari tipi di peli e le ghiandole sudoripare iniziano a formarsi in stadi precisi (*Guard*, E14.5; *Awl*, E16.5; *Zigzag*, E18.5; Ghiandole sudoripare, E17.5), mentre, i topi *Tabby* mancano di ghiandole sudoripare e non presentano i diversi sottotipi di peli, ma una variante anormale di peli *Awl*, quindi, la mancanza di *Eda* non modifica il numero di follicoli piliferi ma il tipo di pelo prodotto (Cui et al., 2008; Cui e Schlessinger, 2006).

L'induzione del gene *Eda-A1* in determinati stadi embrionali nel modello murino Tabby determina induzione e progressione di peli *Guard*, *Awl*, ghiandole sudoripare (durante la formazione della papilla dermica del follicolo pilifero) e peli di tipo *Zigzag* (in seguito alla formazione della papilla dermica) (Figura 8) (Cui et al., 2008).

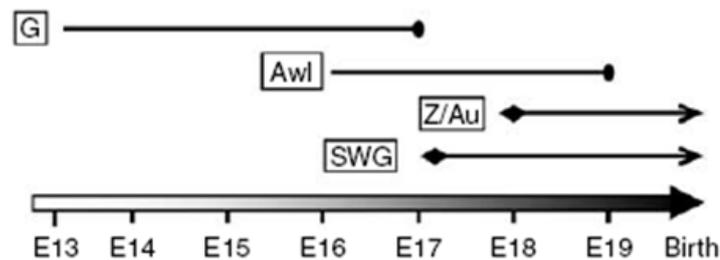


Figura 8: Rappresentazione schematica della finestra temporale di azione di EDA durante a formazione di vari sottotipi di annessi epidermici nello sviluppo. Il *pathway* EDA è richiesto per la formazione di peli *Guard* (G) fino ad E17 e peli *Awl* (Awl) fino ad E19. Inoltre, EDA regola la formazione di peli *Zigzag* (Z) ed *Auchen* (Au) a partire da E18 e la formazione di ghiandole sudoripare (SWG) da E17. (Cui et al., 2008).

A livello molecolare dunque, i *pathways* EDA e WNT sono coinvolti nella formazione della placca pilifera, invaginazione e determinazione del pelo mediante soppressione di *Bmp4* [tramite up-regolazione del suo inibitore, CCN2/CTGF (CNN2/*connective tissue growth factor*)] ed attivazione di *Shh* e *Ltβ* (Cui et al., 2006; Cui et al., 2008; Pummila et al., 2007). Questi *pathways* sono, tra i maggiori partecipanti nello sviluppo e maturazione del tipo di annesso epidermico agendo con ulteriori effettori quali *Notch*, *Whn* ed *Hox* con meccanismi ancora poco conosciuti (Cui et al., 2008).

Il ruolo cruciale del *pathway* EDA durante lo sviluppo di annessi epidermici, si può manifestare anche a livello post-nascita come

suggerisce l'associazione tra l'espressione di *Edar* e la diminuzione di proteine XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) in pelle e follicoli piliferi individuando XIAP come possibile *target* di EDAR/NF-κB. Le proteine XIAP regolano, infatti, i processi apoptotici dei cheratinociti durante i vari cicli di rigenerazione del pelo (Fessing et al., 2006).

Inoltre, alcuni studi di espressione in tessuti adulti mostrano l'espressione del gene *EDA* in altri tessuti diversi da quelli affetti dalla sindrome (es. epidermide, follicoli e ghiandole sudoripare) come tubuli renali, epitelio di ghiandola mammaria e di dotti prostatici, timo, esofago, cervello ecc... Quindi, *EDA* non è ristretta solo alle cellule epiteliali suggerendo la presenza di meccanismi regolatori specifici che ne controllano l'espressione ed ancora poco conosciuti. Non è riportata, infine, una dettagliata analisi negli stessi tessuti per il gene *EDAR* (Mikkola e Thesleff, 2003; Headon e Overbeek, 1999; Cui et al., 2002; Montonen et al., 1998).

1.7. Regolatori ed effettori del pathway *EDA*

Per la comprensione del ruolo del *pathway* *EDA* nello sviluppo degli annessi epidermici è necessario sapere come esso viene regolato e come regoli possibili geni *target*. Precedenti studi dimostrano che il gene *EDA* è attivato pienamente dal *pathway* WNT, coinvolto nel normale sviluppo embrionale e nella rigenerazione del tessuto osseo (Chen e Alman, 2009), mediante il fattore LEF1, pertanto, in accordo con tale risultato, *Eda* non è espresso nella pelle di topi *Lef1*^{-/-} (Cui e Schlessinger, 2006) che presentano difetti nello sviluppo di vari organi fra cui peli, denti e vibrisse (Laurikkala et al., 2002). Ciò suggerisce un ruolo essenziale per LEF1 come fattore coinvolto nella generazione di

follicoli piliferi (Shindo et al., 2003). Anche *β-catenin*, noto attivatore di trascrizione indotta da LEF1, è stato associato alla regolazione della formazione del follicolo pilifero. Infatti, l'over-espressione di *β-catenin* induce la morfogenesi di nuovi follicoli piliferi (Pengue et al., 1999; Laurikkala et al., 2002; Shindo et al., 2003).

Molto verosimilmente WNT/LEF1 non è il solo *pathway* induttore di EDA in quanto, mentre *Lef1* ha espressione nei follicoli piliferi, *Eda* è largamente espresso anche nel resto della pelle (Laurikkala et al., 2002). Come suggerisce la presenza di siti *SP1* sul promotore di *Eda*, altri fattori potrebbero agire su EDA tra cui i membri delle famiglie GATA e NKK2 che solitamente interagiscono con *SP1* al fine di influenzare, durante lo sviluppo, la specificità tissutale e l'espressione ristretta di *target* genici. La loro possibile interazione con EDA risulta, però, ancora una ipotesi da approfondire (Figura 9) (Cui e Schlessinger, 2006).

A sua volta, EDA agisce regolando vari *pathways* tra cui WNT stesso, BMP, SHH (Cui e Schlessinger, 2006) e $LT\beta$ (Cui et al., 2007). Tali fattori sono coinvolti nello sviluppo di annessi ectodermici ma variazioni nei loro meccanismi di azione determinano "effetti estremi" come tumorigenesi, letalità embrionale e formazione eccessiva di annessi. In contrasto, EDA è specifico per la pelle ed alterazioni a suo carico influenzano solo segnali morfogenetici durante lo sviluppo di annessi ectodermici (Cui e Schlessinger, 2006). Il *pathway* EDA viene attivato da WNT ed EDA, a sua volta, agisce con un meccanismo di *feedback* nella regolazione di WNT stesso tramite attivazione di antagonisti di WNT, *Dkk1* e *Dkk4* (Durmowicz et al., 2002). Questo possibile fenomeno di *feedback* potrebbe determinare un bilancio per

garantire un buon funzionamento dei meccanismi morfogenetici evitando il loro potenziale "effetto estremo" (Cui e Schlessinger, 2006).

Altro *target* di EDA è SHH, membro del *pathway Sonic Hedgehog* (OMIM_600725), coinvolto nella determinazione degli assi antero-posteriori durante lo sviluppo embrionale. *Shh* è coinvolto nello sviluppo di vari tipi di follicoli piliferi e ghiandole sudoripare, infatti, topi *Shh*^{-/-} presentano un arresto dello sviluppo di follicoli durante la vita embrionale. A conferma del possibile coinvolgimento di SHH nello sviluppo di annessi epidermici e della sua interazione con il *pathway* EDA, *Shh* viene *up*-regolato in presenza del transgene *Eda-A1* mentre è *down*-regolato in topi Tabby (Cui et al., 2006). L'over-espressione di *Shh* non induce la formazione dei follicoli ma induce tumore nelle cellule basali della pelle. Il potenziale "effetto estremo" dato dall'attivazione di SHH è frenato dall'azione degli inibitori specifici PTC/HHIP, attivati da EDA con meccanismo di *feedback* negativo. Nonostante l'influenza di EDA sul *pathway* SHH, il meccanismo di interazione tra i due *pathways* non è ancora del tutto chiaro (Figura 9) (Cui e Schlessinger, 2006).

Il *pathway* EDA, inoltre, inibisce il *pathway* BMP, coinvolto nella morfogenesi ossea durante lo sviluppo embrionale (Zouvelou et al., 2009), tramite over-espressione di specifici inibitori come *Sostdc1* e *Noggin* (Figura 9). Nonostante il preciso meccanismo di azione di EDA su tali inibitori non sia chiaro, essi risultano espressi a livello di follicoli piliferi ed in topi Tabby, *Sostdc1* viene *down*-regolato mentre, *Noggin* non subisce variazioni. La *up*-regolazione di *Noggin*, inoltre, determina

l'aumento del numero di follicoli piliferi e topi *Noggin*^{-/-} presentano un numero minore di follicoli (Cui et al., 2006).

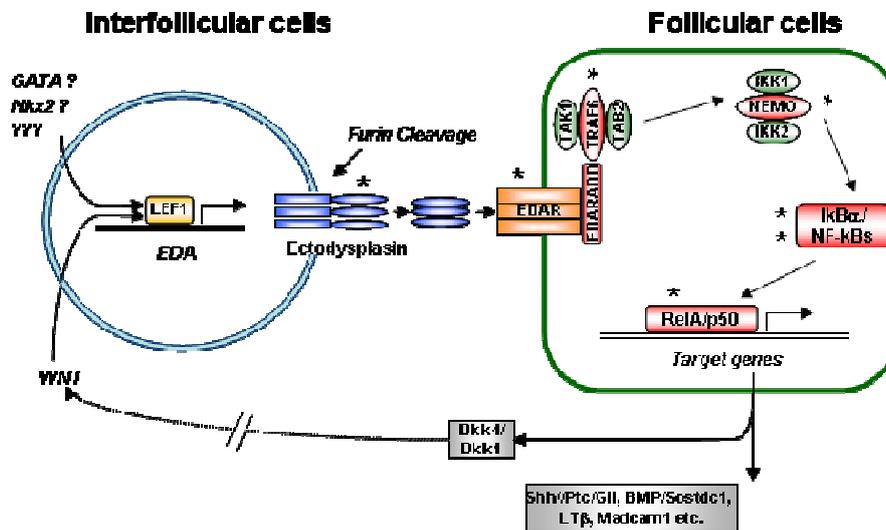


Figura 9: Rappresentazione schematica del pathway EDA. EDA è espresso in cellule interfollicolari mentre EDAR in cellule follicolari. WNT/LEF1 ed altri possibili segnali (GATA, Nkx2 ed altri ???) regolano la trascrizione. La proteina prodotta viene tagliata da proteasi furiniche e lega il recettore EDAR il quale, recluta l'adattatore citoplasmatico EDARADD e, tramite TRAF6/TAK1/TAB2 attiva NEMO/complesso IKK. Tale complesso fosforila le proteine IκBs permettendo ad NF-κB di entrare nel nucleo ed attivare geni *target*. *Targets* di EDA sono WNT/Dkks, Shh, BMP/Sostdc1, LTβ e Madcam1. EDA potrebbe regolare, infatti, WNT con *feedback* mediante Dkk4 e Dkk1. Gli asterischi indicano mutanti che causano fenotipo EDA-like in pazienti o modelli murini. Mutazioni in TRAF6, NEMO, IκBα o NF-κBs determinano fenotipo EDA associato ad Immunodeficienza. (Cui e Schlessinger, 2006)

LTβ (Linfotossina beta), nuovo membro della famiglia TNF, in grado di attivare NF-κB secondo il *pathway* alternativo (Courtois, 2005; Saitho et al., 2002) è stato identificato recentemente come *target* di EDA (Cui et al., 2006). Si tratta di una citochina coinvolta nel sistema immunitario dove agisce nell'organogenesi dei linfonodi in cooperazione con LTα e LTBR. LTβ, agendo in parte con le proteine KAP (*keratin associated proteins*, proteine coinvolte nella formazione di fibre di cheratine in peli ed epidermide), interviene negli stadi tardivi

dello sviluppo del pelo e regola l'omeostasi del periderma, un tessuto transitorio derivato da cheratinociti basali di epidermide che ricopre l'embrione negli stadi E8.5 - E18.5 (Cui et al., 2007; Cui e Schlessinger, 2006; Cui et al., 2006). $LT\beta$ contribuisce a modulare la struttura del pelo durante il differenziamento, infatti, topi $LT\beta^{-/-}$ presentano i tre tipi di peli (*Guard*, *Zigzag* ed *Awl*) in una variante anormale ma non mostrano alterazioni alle ghiandole sudoripare. L'azione di $LT\beta$ potrebbe esplicarsi tramite un nuovo recettore in quanto topi $LT\alpha^{-/-}$ e $LTBR^{-/-}$ presentano follicoli e peli normali. L'azione di $LT\beta$ nell'epidermide è indipendente dal suo ruolo svolto nei linfonodi, infatti, topi $LT\beta^{-/-}$ con midollo osseo Wild-type mantengono i peli con struttura anormale (Cui et al., 2007). Tali topi mutanti, inoltre, presentano un distacco del periderma embrionale in stadi più precoci rispetto al Wild-type. Questo fenomeno avviene anche in topi *Tabby* nonostante sia un processo più lento se comparato ai topi $LT\beta^{-/-}$ (Cui et al., 2007; Cui et al., 2006).

Infine, il gene *Madcam1* (*mucosal addressin cell adhesion molecule 1*) è stato definito come possibile *target* di EDA. Tale gene è espresso in modo transiente durante la formazione di follicoli per peli *Guard* e, in accordo al suo possibile ruolo come effettore di EDA, non è espresso in topi *Tabby*, *Downless* e *Traf6^{-/-}*. *Madcam1* è, inoltre, un possibile *target* del *pathway* delle linfofosfine nel sistema immunitario, pertanto, si ipotizza una cooperazione tra i membri di questi *pathways* durante lo sviluppo del follicolo pilifero (Cui e Schlessinger, 2006).

1.8. Displasia Ectodermica Anidrotica con Immunodeficienza X-linked (XL-EDA-ID)

Nella categoria delle Displasie Ectodermiche rientra la patologia umana Displasia Ectodermica Anidrotica con Immunodeficienza X-linked recessiva (XL-EDA-ID, OMIM_300291), di cui si riportano circa 30-40 pazienti al mondo (Courtois e Smahi, 2006; Ku et al., 2005). Tale sindrome è stata riportata per la prima volta in un paziente di sesso maschile morto per tubercolosi e poi, successivamente, in altri pazienti affetti da diversi tipi di infezioni (Doffinger et al., 2001). La forma EDA-ID è, infatti, una rara immunodeficienza primaria clinicamente molto eterogenea con le stesse caratteristiche dei soggetti affetti da EDA "Classico" talvolta in forma più lieve (Carrol et al., 2003). I pazienti mostrano, dunque, ipodontia o anodontia con pochi denti di forma conica, pelle secca con ipoidrosi o anidrosi ed intolleranza al calore ed ipotricosi o atricosi (Figura 10a) (Ku et al., 2005). Già nei primi mesi di vita i soggetti affetti soffrono di frequenti infezioni determinate da batteri piogeni *Gram positivi* e *Gram negativi* come *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, micobatteri come *Mycobacterium avium*, virus tra cui *Haemophilus influenzae*, *Herpes simplex*, *Cytomegalovirus* e funghi come *Pneumocystis jiroveci*. I tessuti colpiti dalle infezioni sono periferici come pelle, sistemi respiratorio e digestivo con i limitrofi linfonodi e, tramite l'azione del flusso sanguigno, organi più interni come fegato, milza, ossa ed articolazioni (Ku et al., 2005; Mancini et al., 2008). In alcuni casi i pazienti presentano irregolarità nella sintesi di immunoglobuline, sindrome di Iper-immunoglobulinemia-M con livelli bassi o assenti di IgG, IgA ed IgE, difetti nell'attivazione di cellule B tramite CD40, alterazioni a carico di cellule T, anomalie nell'attività di cellule NK (*Natural Killers*) del sistema immunitario e bassa risposta ad LPS, IL-

1 β e TNF α (Jain et al., 2001; Ku et al., 2005; Orange et al., 2004; Nishikomori et al., 2004)

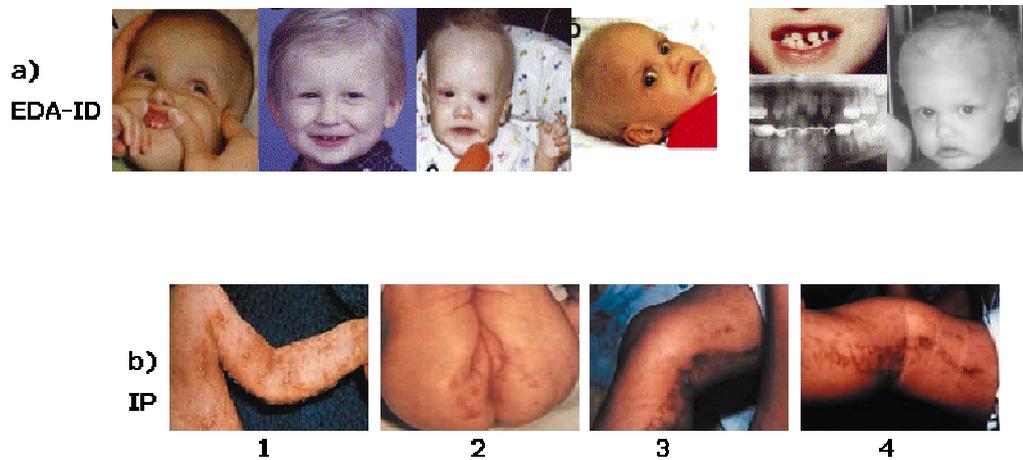


Figura 10: Caratteristiche fenotipiche di pazienti EDA-ID ed Incontinentia Pigmenti. a) I pazienti riportati presentano mutazioni nel gene *NEMO* ed il caratteristico fenotipo EDA (che include ipotricosi, pelle secca, fronte sporgente, oligodontia e denti conici) associato ad Immunodeficienza. (Zonana et al, 2000; Orange et al., 2004). **b)** Evoluzione delle lesioni cutanee dell'Incontinentia Pigmenti attraverso 4 stadi tipici: lesioni vescicolose, verruche, zone di iper-pigmentazione e cicatrici.

Alcuni pazienti, inoltre, non presentano il completo fenotipo EDA ma solo alterazioni a carico dei denti e le ricorrenti infezioni (Orange et al., 2004; Niehues et al., 2004) mentre, altri presentano un fenotipo più severo con Osteopetrosi e Linfedema (OL-EDA-ID, OMIM_3003011) che, rispettivamente, determinano un minore riassorbimento osseo da parte di osteoclasti ed alterazioni dei vasi linfatici con accumulo di liquidi ed altre sostanze negli spazi intercellulari (Dupois-Girod et al., 2002)

EDA-ID è una patologia ereditata come tratto *X-linked* recessivo il cui gene mutato è *NEMO* (*NF-kB essential modulator*, OMIM_300248) localizzato nella regione Xq28 (OMIM_300284) (Carrol et al., 2003; Courtois, 2005; Fusco et al., 2008). *NEMO* è un regolatore del

complesso IKK per cui la sua corretta funzionalità è essenziale all'attivazione di NF- κ B (Carrol et al., 2003; Courtois, 2005; Fusco et al., 2008). La sua struttura proteica, infatti, presenta due domini *Coiled Coil*, CC1 (coinvolto nell'interazione con IKK) e CC2 (coinvolto nell'oligomerizzazione della proteina), un dominio *Leucine Zipper* LZ (coinvolto nell'oligomerizzazione insieme a CC2), un dominio di ubiquitinazione ed, infine, un dominio *Zinc Finger* ZF (coinvolto nell'attivazione di NF- κ B in risposta a TNF α , IL-1 β , LPS o altre citochine pro-infiammatorie) (Figura 11) (Fusco et al., 2008).

Mutazioni che causano perdita di funzione di NEMO determinano la patologia Incontinentia Pigmenti (IP, OMIM_308310) in cui c'è inattivazione completa di NF- κ B (Zonana et al., 2000). L'IP è una grave genodermatosi *X-linked* dominante presente nelle donne in quanto si verifica una maggiore suscettibilità all'apoptosi ed una tendenza a letalità embrionale nei maschi. Le donne affette presentano un alterato *pattern* di inattivazione (*skewed*) del cromosoma X, in quanto, le cellule che esprimono il cromosoma X mutato sono eliminate selettivamente (Courtois e Smahi, 2006). Nel 60-80% dei casi IP, la mutazione presente è una delezione degli esoni 4-10 del gene *NEMO* ma sono state riportate anche altre mutazioni (piccole delezioni, sostituzioni e duplicazioni) in altre regioni del gene (Figura 11) (Fusco et al., 2008). Nelle pazienti la patologia determina anomalie della pigmentazione della pelle, gravi malformazioni a carico del sistema nervoso centrale e problemi oftalmologici ed odontologici. I caratteristici segni clinici a carico della pelle seguono 4 classici stadi cutanei: lesioni vescicolose simili a varicella o herpes nei neonati (1) che possono diventare verrucose (2) e generare zone di iper-

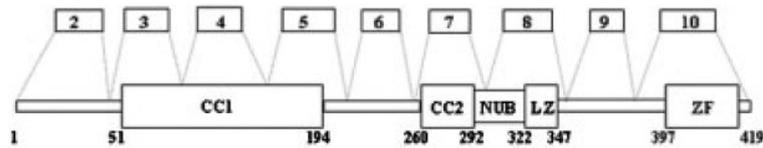
pigmentazione (3) fino a cicatrici più o meno estese (4) che tendono a regredire spontaneamente con l'età (Figura 10b) (Jentarra et al., 2006).

Nel caso della patologia EDA-ID le mutazioni nel gene NEMO sono principalmente missenso o piccole delezioni, soprattutto nella regione del dominio *Zinc Finger* (Figura 11). Tali mutazioni riducono ma non aboliscono completamente la funzione di NF- κ B, pertanto, pazienti di sesso maschile riescono a sopravvivere mentre le femmine portatrici sono sane o mostrano lievi segni di *Incontinentia Pigmenti* (Doffinger et al., 2001; Fusco et al., 2008). La patologia, dunque si presenta nei maschi (Zonana et al., 2000) in quanto, raramente le donne manifestano a pieno una patologia *X-linked* recessiva. In letteratura è riportato, infatti un unico caso di donna EDA-ID eterozigote con mutazione ipomorfica nel gene NEMO (Kasaki et al., 2001).

Una mutazione nello *stop codon* di *NEMO* è responsabile, inoltre, della forma EDA-ID associata a Linfedema ed Osteopetrosi (Cordier et al., 2008)

Fattori che determinano la diversità tra le patologie EDA-ID e IP potrebbero essere sia le diverse posizioni delle mutazioni sul gene sia la rapida e progressiva eliminazione, nei pazienti IP, delle cellule del sangue con il cromosoma X recante la forma mutata di NEMO. I pazienti IP, pertanto, a differenza dei pazienti EDA-ID, non soffrono di Immunodeficienza (Courtois e Smahi, 2006). Inoltre, mentre il difetto a carico degli annessi epidermici è costante, la variabilità del fenotipo infettivo sembra associata al tipo di mutazione presente nelle diverse regioni del gene *NEMO* e, dunque, al livello residuo di attivazione di NF- κ B che ne deriva (Fusco et al., 2008).

La patologia EDA-ID può essere trasmessa anche in modo autosomico dominante con mutazioni nel gene $I\kappa B\alpha$ (OMIM_164008), localizzato sul cromosoma 14 in regione q13 (Courtois et al., 2003). In particolare, in letteratura è riportata una mutazione missenso a carico del sito di fosforilazione della proteina (Ser32) per cui $I\kappa B\alpha$ non viene fosforilato e degradato e non rilascia il fattore NF- κB per la sua migrazione nel nucleo (Chang et al., 2008). Questa forma di EDA-ID è associata ad una grave alterazione a carico di cellule T del sistema immunitario con assenza di cellule T di memoria e disturbi nella risposta a stimoli TCR-CD3 (Courtois et al., 2003).



Number	Nucleotide change ^a NN_003639.3	Amino acid change ^b NP_003630.1	Exon/ intron	Mutation type	Clinical diagnosis
1	c.111dupC ^c	p.Me38HisfsX12	Exon 2	Frameshift	EDA-ID
2	c.117_127dup	p.Ser43CysfsX76 ^c	Exon 2	Frameshift	IP
3	c.133C>T ^{ah}	p.Gln45X ^{ah}	Exon 2	Nonsense	IP
4	c.149G>A	p.Glu57Lys	Exon 2	Missense	IP
5	c.184C>T ^{ah}	p.Arg62X ^{ah}	Exon 2	Nonsense	IP
6	c.210delC	p.Leu72CysfsX43	Exon 3	Frameshift	IP
7	c.220delG	p.Glu74SerfsX41 ^f	Exon 3	Frameshift	IP
8	c.229delG ^h	p.Glu77ArgfsX38 ^{ah}	Exon 3	Frameshift	IP
9	c.239T>C	p.Leu80Phe	Exon 3	Missense	EDA-ID
10	c.256C>T ^h	p.Gln86X ^{ah}	Exon 3	Nonsense	IP
11	c.266_268del ^g	p.Lys90del	Exon 3	In-frame deletion	IP
12	c.292C>T	p.Gln98X	Exon 3	Nonsense	IP
13	c.337G>A ^h	p.Asp113Asn ^{ah}	Exon 3	Missense	IP
14	c.367C>T	p.Arg123Trp	Exon 3	Missense	IP
15	c.399+1G>C	NA	Intron 3	Splice site	IP
16	c.454delG ^h	p.Glu152SerfsX129 ^{ah}	Exon 4	Frameshift	IP
17	c.458T>G	p.Leu153Arg	Exon 4	Missense	EDA-ID
18	c.515_516insC ^{ah}	p.Arg155SerfsX13 ^{ah}	Exon 4	Frameshift	IP
19	c.516delI	p.Arg156IysfsX108 ^h	Exon 4	Frameshift	IP
20	c.517C>G	p.Arg156Gly	Exon 4	Missense	EDA-ID
21	c.518+2T>A	NA	Intron 4	Splice site	IP
22	c.523dupC ^f	p.Arg157ProfsX13 ^f	Exon 5	Frameshift	IP
23	c.524G>C	p.Arg157Pro	Exon 5	Missense	EDA-ID
24	c.551_558del	p.Leu184ArgfsX57 ^m	Exon 5	Frameshift	IP
25	c.570delG	p.Leu191CysfsX50 ^h	Exon 5	Frameshift	IP
26	c.638_642dup	p.Me1215SerfsX68 ^h	Exon 5	Frameshift	IP
27	c.639_645del	p.Arg214SerfsX65 ^h	Exon 5	Frameshift	IP
28	c.662C>A ^h	p.Ser221X ^{ah}	Exon 5	Nonsense	IP
29	c.680T>C	p.Leu227Pro	Exon 6	Missense	EDA-ID
30	c.706C>T	p.Gln236X	Exon 6	Nonsense	IP
31	c.715C>T	p.Gln239X	Exon 6	Nonsense	IP
32	c.723C>G	p.Ily241h	Exon 6	Nonsense	IP
33	c.766C>T ^h	p.Arg256X ^{ah}	Exon 6	Nonsense	IP
34	c.768+5G>A	NA	Intron 6	Splice site	EDA-ID
35	c.792dupA	p.Gln265ThrfsX19 ^h	Exon 7	Frameshift	IP
36	c.811_828del	NA	Exon 7	In-frame deletion	EDA-ID
37	c.863C>G	p.Ala288Gly	Exon 7	Missense	EDA-ID
38	c.868C>T	p.Gln290X	Exon 7	Nonsense	IP
39	c.896delC	p.Pro299ArgfsX3 ^f	Exon 7	Frameshift	IP
40	c.931G>A	p.Asp311Asn	Exon 8	Missense	EDA-ID
41	c.944A>C	p.Glu315Ala	Exon 8	Missense	ANCBN1
42	c.943dupG ^g	p.Glu315IysfsX80	Exon 8	Frameshift	IP
43	c.956G>A ^f	p.Arg319Gln	Exon 8	Missense	ANCBN1
44	c.967G>C ^{ah}	p.Ala323Pro ^{ah}	Exon 8	Missense	IP
45	c.1056-1G>A	NA	Intron 8	Splice site	EDA-ID
46	c.1078delC ^f	p.His360MetfsX91	Exon 9	Frameshift	IP
47	c.1110delC ^{ah}	p.Ala371ProfsX80 ^{ah}	Exon 9	Frameshift	IP
48	c.1110dupC ^{ah}	p.Ala371ArgfsX24	Exon 9	Frameshift	IP, EDA-ID
49	c.1115dupC ^{ah}	p.Ala373CysfsX22 ^{ah}	Exon 9	Frameshift	IP
50	c.1116delI ^f	p.Ala373ProfsX78 ^f	Exon 9	Frameshift	IP
51	c.1127_1131del ^{ah}	p.Ser377IysfsX16 ^{ah}	Exon 10	Frameshift	IP
52	c.1186_1187del ^{ah}	p.Leu379ArgfsX16 ^{ah}	Exon 10	Frameshift	IP
53	c.1150C>T	p.Gln384X	Exon 10	Nonsense	IP
54	c.1163_1175del	p.Pro388HisfsX59 ^{ah}	Exon 10	Frameshift	IP
55	c.1166_1178dup	p.Arg394ArgfsX5 ^{ah}	Exon 10	Frameshift	IP
56	c.1167delC ^{ah}	p.Glu390ArgfsX61 ^{ah}	Exon 10	Frameshift	IP
57	c.1167dupI ^{ah}	p.Glu390ArgfsX5	Exon 10	Frameshift	IP, EDA-ID
58	c.1171G>T	p.Glu391X	Exon 10	Nonsense	EDA-ID
59	c.1183_1184del ^{ah}	p.Phe395LeufsX11 ^{ah}	Exon 10	Frameshift	IP, EDA-ID
60	c.1201C>T	p.Gln401X	Exon 10	Nonsense	EDA-ID
61	c.1207C>T	p.Gln403X	Exon 10	Nonsense	EDA-ID
62	c.1217A>T	p.Asp406Val	Exon 10	Missense	EDA-ID
63	c.1219dupA ^{ah}	p.Me407AsnfsX13	Exon 10	Frameshift	EDA-ID
64	c.1219A>G	p.Me407Val	Exon 10	Missense	EDA-ID
65	c.1244dupI ^{ah}	p.Me415IlefsX5 ^{ah}	Exon 10	Frameshift	EDA-ID
66	c.1249T>C ^f	p.Cys417Arg	Exon 10	Missense	EDA-ID
67	c.1250G>T	p.Cys417Phe	Exon 10	Missense	EDA-ID
68	c.1250G>A	p.Cys417Tyr	Exon 10	Missense	EDA-ID
69	c.1259A>G ^f	p.X420TrpfsX27	Exon 10	Nonstop	IP, OL-EDA-ID
70	c.399-?_1260+?del ^{ah}	NA	—	—	IP
71	c.399+850_674dup ^{ah}	NA	—	—	EDA-ID

Figura 11: Struttura schematica della regione codificante di NEMO (ex.2-10) e dei domini proteici ed elenco delle mutazioni in NEMO responsabili di EDA-ID ed IP. [Coiled Coil, (CC1 e CC2), Leucine Zipper (LZ), ubiquitinazione (NUB) e Zinc Finger (ZF)]. (Adattata da Fusco et al., 2008).

Scopo del lavoro

Le Displasie Ectodermiche sono un gruppo eterogeneo di circa 200 patologie genetiche che si manifestano con alterazioni anatomiche a carico di distretti di derivazione embrionale ectodermica, con una frequenza nella popolazione generale pari a 7:10.000 nati. La forma più comune è la Displasia Ectodermica Anidrotica/Ipoidrotica (EDA/HED) che influenza lo sviluppo di ghiandole sudoripare, follicoli piliferi e denti sia negli uomini che negli animali. Tale patologia è causata da mutazioni nei membri del *pathway* EDA associato all'attivazione del fattore *NF-kB* attraverso *TRAF6*, *NEMO* ed *IkB α* . I membri del *pathway* sono il ligando ectodisplasina (*EDA*), il recettore *EDAR* e l'adattatore del recettore *EDARADD* e rappresentano una nuova famiglia ligando/recettore/adattatore TNF (*tumor necrosis factor*), la prima ad essere coinvolta nello sviluppo di derivati ectodermici. Mutazioni in *EDA*, *EDAR* ed *EDARADD* causano, infatti, alterazioni nello sviluppo degli annessi epidermici e, mutazioni addizionali in *TRAF6*, *NEMO*, *IkB α* e geni *NF-kB*, causano ulteriori disequilibri nel sistema immunitario. In particolare, mutazioni nel gene *NEMO* (*NF-kB essential modulator*), sono associate alla Displasia Ectodermica Anidrotica con Immunodeficienza X-linked (XL-EDA-ID) in cui, i comuni sintomi della patologia EDA sono associati a frequenti infezioni batteriche, fungine e virali. Il presente dottorato di ricerca è volto alla comprensione della patologia EDA affrontando due particolari tematiche di studio quali l'analisi, in cheratinociti primari murini Wild-type e Tabby, del profilo di espressione di geni *target* del *pathway* EDA e la preparazione di un modello murino transgenico con over-espressione tessuto-specifica del gene *Nemo* portatore di mutazione per lo studio della patologia EDA associata ad immunodeficienza. La

prima parte del lavoro si basa, dunque, sull'analisi del profilo di espressione di geni *target* del *pathway* di EDA avvalendosi del modello murino Tabby. Analisi preliminari di *microarrays* su cheratinociti di embrioni murini Wild-type e Tabby allo stadio E19.5 hanno, infatti, rilevato 385 geni candidati la cui espressione è influenzata da alterazioni nel gene *Eda*. La comparazione con profili di espressione eseguiti su epidermide di modelli murini transgenici *Eda-A1*, ha ristretto la lista a 38 geni candidati, di cui 14 sono già riportati essere espressi in epidermide e follicoli piliferi. Durante questo lavoro, le tecniche di Real-Time PCR quantitativa e Western blotting sono state impiegate per confermare, sia in cheratinociti primari che in pelle di embrioni a diversi stadi di sviluppo, le variazioni nel livello di espressione per 3 geni, *Tbx1*, *Bmp7*, e *Jag1*, selezionati dalle analisi con *microarrays*.

La seconda parte del progetto di ricerca ha come obiettivo la preparazione del modello murino transgenico utile allo studio della patologia umana EDA. In particolare, un modello che presenti over-espressione del gene *Nemo*, portatore di una tra le più frequenti mutazioni ritrovate nei pazienti EDA-ID, C417R (C409R in topo), sotto il promotore K-17, espresso specificamente in alcuni distretti dell'epidermide. L'espressione del transgene confinata all'epidermide dovrebbe permettere di delineare, nei topi, gli effetti della mutazione del gene *Nemo* consentendo un fenotipo EDA senza implicazioni dovute all'immunodeficienza e, pertanto, potrebbe essere comparato al fenotipo del topo Tabby utilizzato per lo studio della patologia EDA. A tal fine, saranno impiegate tecniche di clonaggio per la realizzazione del vettore utile alla generazione del modello murino, tecniche di

Western blotting e saggi di attività luciferasica per un'analisi di funzionalità del costrutto. In seguito all'iniezione pronucleare del vettore, così preparato, è stato eseguito un preliminare studio dei topi ottenuti, mediante analisi genotipica ed osservazione del fenotipo.

3. Materiali e Metodi

“Analisi di espressione genica in cheratinociti primari di topi Wild-type e Tabby”

3.1. Isolamento di cheratinociti primari e colture in vitro

I cheratinociti primari utilizzati in questo lavoro derivano dal dorso di embrioni allo stadio E19 (ottenuti dall'incrocio di topi maschi Wild-type, C57BL/6J e topi Tabby femmine, C57BL/6j-A^{W-J}-Ta^{6J}). In questo stadio i follicoli piliferi di diversi tipi di peli (*Guard*, *Awl* e *Zigzag*) sono in via di sviluppo, per cui la popolazione cellulare isolata risulta eterogenea includendo cellule epidermiche provenienti da diversi tipi di follicoli.

I cheratinociti primari sono stati coltivati in terreno CnT-07 (Chemicon International, MA, USA) a 37°C ed al 5% di CO₂. Quando le cellule hanno raggiunto una confluenza all' 80% sono state lavate con buffer salino fosfato, PBS ed il DNA genomico è stato isolato da ogni linea cellulare mediante *DNase Tissue Kit* (Qiagen, CA, USA). La genotipizzazione del DNA genomico, per determinare la presenza della mutazione Tabby, è stata effettuata mediante reazione di PCR con il set di primer Ta-Mu e successiva digestione enzimatica come descritto in Cui et al., 2006. Entrambi i tipi di cheratinociti (Wild-type e Tabby) sono morfologicamente eterogenei e crescono lentamente fino al passaggio 7 mentre, in seguito, la crescita risulta accelerata ed accompagnata da immortalizzazione spontanea.

3.2. Estrazione di RNA, espressione genica e Real-Time PCR

L'RNA totale è stato estratto da cheratinociti primari Wild-type e Tabby ai passaggi 7-9 mediante il reagente *Trizol* (Invitrogen, CA, USA) e purificato mediante precipitazione con LiCl come descritto in Cui et al., 2005. La qualità dell'RNA è stata poi controllata mediante corsa elettroforetica.

Precedentemente, l'RNA di tali cellule al passaggio 4 era stato utilizzato per analisi di espressione tramite l'utilizzo di "oligo" *microarrays Agilent* (60 bp) sul genoma totale (44.000 geni) rivelando una serie di geni candidati. Alcuni geni selezionati dall'analisi con *microarrays* sono stati sottoposti ad analisi mediante Real-Time PCR quantitativa con il *kit One-step Real-time PCR* tramite l'utilizzo di sistemi oligonucleotidi/sonde *TaqMan* (Applied Biosystems, NJ, USA) per verificare i diversi livelli di espressione tra i campioni tramite i valori di C_t (numero di ciclo durante il quale la fluorescenza di ciascun campione raggiunge un valore soglia) ottenuti. Le reazioni sono state eseguite in triplicato con *ABI 7900H Sequence Detection System* (Applied Biosystems, CA, USA) con il seguente programma: 48°C x 30 min.; 95°C x 10 min.; e poi 40 cicli a 95°C x 15 sec. e 60°C x 1 min. Ogni *set* di reazione è stato effettuato utilizzando controlli senza templatato.

Per quantificare le variazioni di espressione genica relative è stato seguito il metodo $-2^{\Delta\Delta CT}$ [$2^{(CT_{geneX} - CT_{GAPDH})_{Wt} - (CT_{geneX} - CT_{GAPDH})_{Ta}}$] (Livak e Schmittgen, 2001) e le reazioni sono state normalizzate con il gene GAPDH (Gliceraldeide 3-fosfato Deidrogenasi). Inoltre, RNA da campioni di epidermide di embrioni Wild-type e Tabby negli stadi E15.5, E16.5, E18.5 e giorno 1 post-nascita (P1) è stato estratto e sottoposto alla medesima analisi di espressione per Real-Time PCR.

3.3. Estrazione di proteine e Western Blotting

I cheratinociti primari sono stati raccolti e sottoposti ad estrazione di proteine mediante l'utilizzo di *RIPA buffer* freddo [150mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% sodio desossicolato, 0.1% SDS, 50mM Tris,

pH 8.0.) (Sigma, MO, USA)] con inibitore di proteasi e successiva centrifugazione. Il supernatante ottenuto è stato definito Estratto 1 (Ext. 1) ed il pellet risultante è stato sottoposto ad un secondo trattamento con *RIPA buffer* + 1% SDS (sodio dodecil solfato) e sonicato per ottenere una frazione di proteine meno solubili (Ext. 2). La concentrazione proteica è stata poi misurata secondo il metodo *Bradford*, mediante *Bio-Rad protein assay system* (Bio-Rad, CA, USA). Per valutare, inoltre, una attivazione del *pathway* di EDA in seguito a stimolazione con proteina *mouse-EDA* ricombinante (500ng/ml) (R&D Systems, MN, USA), le cellule sono state raccolte e, con l'utilizzo del *kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Pierce, IL, USA), sono stati ottenuti campioni proteici relativi alla frazione citoplasmatica e nucleare. Come controllo di attivazione del *pathway* la stimolazione è stata eseguita anche con $TNF\alpha$, 100ng/ml (Promega, WI, USA). 40 μ g per campione di estratto sono stati denaturati a 100°C per 5 minuti in presenza di 1 \times *NuPAGE LDS loading buffer* [564 mM Tris base, 8% LDS (litio dodecil solfato), 40% glicerolo, 2.04 mM EDTA, 0.88 mM SERVA® Blue G250 and 0.7 mM Phenol Red, pH 8.5] (Invitrogen, CA, USA) contenente β -mercaptoetanololo (5% in volume finale). Le proteine sono state poi separate a 90 Volts costanti mediante gel di acrilammide *Novex® Tris-glicina* al 12% (Invitrogen, CA, USA) e trasferite su membrana di nitrocellulosa (GE Healthcare, NJ, USA) mediante corsa elettroforetica in camera elettroblotting a 4°C a 30 Volts per 15-18 ore o a maggiore voltaggio (100 Volts) per 3 ore. La membrana è stata sottoposta ad un primo lavaggio con TBS (PBS, buffer fosfato salino 1X; Tween-20 0.1 %) e latte scremato in polvere 5 % per 1 ora ed incubato con l'anticorpo primario diluito in TBS e

latte 5%, a 4°C per 15-18 ore. Gli anticorpi includono anti-TBX1 policlonale *rabbit* (Abcam, MA, USA), a diluizione 4µg/ml; anti-PITX1 (N-15) policlonale *goat* (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), a diluizione 1:200; anti-SOX11 (H-290) policlonale *rabbit* (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), a diluizione 1:200; e anti NF-kB policlonale *rabbit* (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), a diluizione 1:200. Per la normalizzazione è stato utilizzato l'anticorpo anti-ACTINA β , policlonale *rabbit* (Bethyl, TX, USA) a diluizione 1:2000. Dopo 3 lavaggi in TBS di 10 minuti, la membrana è stata incubata per due ore a temperatura ambiente, con anticorpi anti-*goat* o anti-*rabbit* secondari coniugati all'enzima perossidasi (HRP) con diluizione 1:2000 e 1:1000 rispettivamente (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Infine è stato eseguito un lavaggio con TBS 1X per 10 minuti. Le bande proteiche sono state poi rilevate mediante il *kit ECL* (Amersham Buckinghamshire, United Kingdom) che prevede l'utilizzo di sostanze chemiluminescenti come substrati per la reazione catalizzata dalla perossidasi. Quindi il filtro è stato esposto ad una lastra fotografica *Kodak* per 1 minuto.

4. Materiali e Metodi

"Studio del gene *Nemo* nella Displasia Ectodermica Anidrotica con Immunodeficienza (EDA-ID)"

4.1. Preparazione dei vettori plasmidici

Il costrutto plasmidico contenente la sequenza codificante del gene *Nemo* murino nella sua forma Wild-type (Wt) e mutata [A282G, (in uomo A288G); C409R, (in uomo C417R); e la mutazione *ex-novo* Δ Znf, delezione del dominio *Zinc Finger* C-terminale] è stato sviluppato ponendo la sequenza del cDNA murino (ORF completa, 1235 nt; ORF Δ Znf, 1133 nt) di *Nemo* sotto il controllo di un promotore epidermide-specifico, K-17, (cheratina-17) al fine di poter permettere l'over-espressione del gene specificamente in alcuni punti dell'epidermide. A tal proposito, è stato utilizzato il vettore pTRE (Clontech Labs, CA, USA) (Figura 12) modificato tramite l'escissione della sequenza relativa al proprio promotore CMV mediante digestione con enzimi XhoI (CTCGAG) e SacII (CCGCGG).

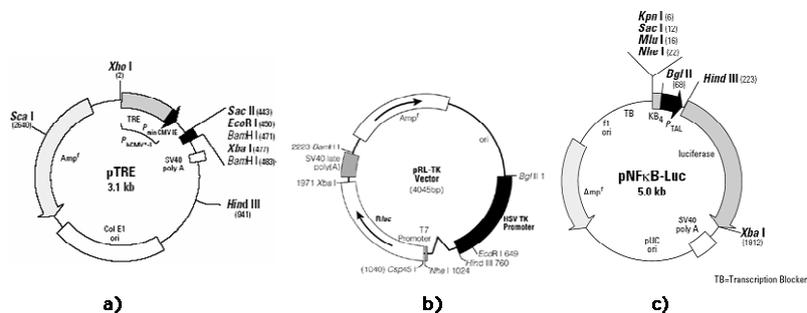


Figura 12: Mappa e sito multiplo di clonaggio di vettori impiegati nel progetto. a) Vettore di espressione pTRE. b-c) Vettori utilizzati per i saggi di luciferasi: (b) *pRL-TK* (*Renilla reniformis*) ed (c) *NF-Kb Luciferase reporter vector*.

La sequenza di 1.9Kb situata a monte del gene K-17 è stata amplificata da DNA genomico murino mediante PCR utilizzando *KOD Hot Start DNA polymerase* (Novagen, WI, USA) con oligonucleotidi disegnati alle estremità della sequenza e contenenti i siti di restrizione necessari al clonaggio direzionale del promotore e sequenze adattatrici

per consentire una maggiore efficienza dell'attività enzimatica: oligonucleotide Fw K17_XhoI : 5'-AATAA**CTCGAGTCTGA TCCTTGAATTCATCATTGT** - 3' ; oligonucleotide Rw K17_SacII: 5' - AAAAA**CCGCGGAGCTGGAGGGCTTGGGAGGA** - 3'. La banda relativa al promotore K-17 è stata dunque purificata mediante il *kit GFX PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare, NJ, USA) e clonata tramite digestione e ligasi nel vettore pTRE modificato. Il vettore è stato poi utilizzato per la trasformazione di cellule competenti *TURBOcell* (Genlantis, CA, USA) per successive mini- e midipreparazioni di DNA plasmidico. La presenza dell'inserito nel vettore è stata poi verificata tramite digestione enzimatica e sequenziamento del plasmide purificato utilizzando il *kit* di reazione *BigDye Terminator* (Applied Biosystems, CA, USA), il *kit* di purificazione di sequenze *DyeEX 96 Kit* (Qiagen, CA, USA) ed *ABI 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, CA, USA). Il vettore, così ottenuto e nominato pT-K17, è stato sottoposto a linearizzazione mediante digestione enzimatica per consentire l'inserimento del cDNA relativo al gene *Nemo* murino di interesse.

Il cDNA murino di *Nemo* Wild-type e mutato è stato ottenuto dal clone l'I.M.A.G.E. ([http:// image. llnl. gov/ image/ html/ igoals. shtml.](http://image.llnl.gov/image/html/igoals.shtml)) BC021431 in cui, la presenza della EST corretta è stata verificata tramite digestione enzimatica e sequenziamento con oligonucleotidi d'innesco standard del vettore di clonaggio. Il frammento per il clonaggio è stato ottenuto mediante reazione di PCR, utilizzando quale stampo il DNA miniprep del clone plasmidico BC021431. La reazione è stata eseguita utilizzando oligonucleotidi opportunamente disegnati alle estremità della ORF_*Nemo* per

amplificare l'intera sequenza codificante Wt ed oligonucleotidi contenenti la mutazione desiderata. In entrambi i casi l'oligonucleotide senso e' stato progettato in modo da contenere la sequenza codificante il marcatore FLAG (**ATGGACTACAAAGATGACGATGACAAG**) ed una sequenza Kozac (**GCCACC**). Anche in tal caso gli oligonucleotidi presentano il sito di restrizione necessario al clonaggio SacII (**CCGCGG**) ed una sequenza adattatrice per l'efficienza dell'enzima. Per l'amplificazione della sequenza ORF_*Nemo* Wt, C409R e Δ Znf, è stato utilizzato lo stesso oligonucleotide senso Fw Nemo_wt/mut-SacII 5'-**AAAACCGCGGGCCACCATGGACTACAAAGATGACGATGACAAGATGAA**
CAAGCACCCCTGGAA -3', mentre, l'oligonucleotide antisenso è stato disegnato specificamente per la forma Wild-type o la forma mutata. Oligonucleotide antisenso per la sequenza Wt: Rw Nemo_wt-SacII 5'-**AAAACCGCGGTCCTACTC TATGCACTCCATGAC** -3'; oligonucleotide antisenso per la preparazione della mutazione C409R, dovuta alla sostituzione T>C: Rw Nemo_C409R-SacII 5'-**AAAACCGCGGTCCTACTCTATGCGCTCCATGAC**-3'; oligonucleotide antisenso per la preparazione del cDNA *Nemo* con delezione del dominio Zinc finger C-terminale; Rw Nemo_ Δ Znf -SacII 3'-**AAAACCGCGGCTACTCCGCTGGTTGGACAAGGC**-5' dotato di codone *stop* TAG (sequenza inversa complementare CTA).

Per la preparazione della mutazione A282G (in uomo A288G), dovuta ad una sostituzione C>G, è stato utilizzato il *kit QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene, CA, USA). Il seguente oligonucleotide è stato disegnato per la reazione di mutagenesi: Rw Nemo_A282G-SacII 5'- GATAAGCTGAAAGAGGAGGG**G**TGAGCAGCACAA GATTGTG-3'. Le bande relative alle varie regioni ORF di *Nemo*, sono

state clonate mediante digestione enzimatica e ligasi nel vettore di interesse ed il DNA plasmidico preparato per ogni costrutto è stato controllato mediante sequenziamento per verificare la presenza dell'inserito specifico ed il suo corretto orientamento.

4.2. Trasfezione transiente e Western Blotting

Il processo di trasfezione consiste nell'introduzione di DNA esogeno in cellule eucariotiche, veicolato da un opportuno vettore. Nel caso della trasfezione transiente, il DNA esogeno non è integrato nel DNA cromosomico ma, rimanendo per diverse ore nel nucleo, è espresso in maniera transitoria perchè sottoposto agli stessi meccanismi di regolazione dei geni endogeni.

La trasfezione transiente dei costrutti preparati è stata eseguita su cellule 293H (cellule di rene umane) e MEF_*Nemo*^{-/-} (fibroblasti embrionali di topo, privi del gene *Nemo*) da cui successivamente sono state estratte le proteine totali per analisi di Western Blotting.

Entrambi i tipi cellulari crescono in monostrato, adese alle piastre di coltura, in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenente FCS 10% (Fetal Calf Serum, siero fetale bovino) ed antibiotici (Pennicillina/Streptavidina, 1%) a 37°C ed al 5% di CO₂. L'esperimento di trasfezione è stato eseguito in piastre da 100 mm e *Multiwell* a 24 pozzetti su cellule ad una confluenza pari al 60-80%, in attiva fase moltiplicativa e ricettiva. Le cellule sono state trasfettate mediante lipofezione utilizzando il kit "*Lipofectamine2000*" (Invitrogen, CA, USA) che impiega i liposomi per introdurre DNA esogeno. Questi sono vescicole lipidiche artificiali in grado di fondersi con la membrana cellulare riversando il loro contenuto direttamente nel citoplasma. Dopo aver somministrato la *mix* di trasfezione alle cellule, in accordo ai

dosaggi suggeriti dalla casa produttrice, le cellule sono state lasciate a 37°C per 48 ore e poi impiegate in tecniche Western blotting.

Le cellule trasfettate sono state lavate in PBS e raccolte per l'estrazione di proteine totali tramite *RIPA buffer* freddo + inibitore di proteasi secondo la metodica discussa in 3.3 relativamente allo studio di espressione genica in cheratinociti primari. Le proteine sono state poi separate mediante corsa elettroforetica su gel e trasferite su membrana di nitrocellulosa per analisi tramite sistema di anticorpi primari e secondari (metodica discussa in 3.3.). Gli anticorpi primari utilizzati includono anti-FLAG (Rockland, PA, USA) policlonale *rabbit* a diluizione 1:2000; anti-NEMO (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) policlonale *rabbit* a diluizione 1:200; anti-ACTINA β policlonale *rabbit* (Bethyl, TX, USA), a diluizione 1:2000, per la normalizzazione della quantità di proteine caricate. Come anticorpo secondario è stato utilizzato anti-*rabbit* coniugato all'enzima perossidasi (HRP) con diluizione 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).

4.3. Saggi di Luciferasi

I saggi di luciferasi permettono di monitorare l'espressione di un gene di interesse clonato in *frame* al gene *reporter* (Luciferasi) mediante rilevamento della luminescenza emessa dal *reporter* stesso. In base a tale principio e' stato possibile rilevare variazioni nell'attività del fattore trascrizionale NF-Kb attivato a valle del *pathway* EDA-NEMO. Per lo svolgimento di questa procedura sono stati eseguiti esperimenti di co-trasfezione transiente in cellule 293H e MEF_*Nemo* -/- al fine di osservare l'attività del fattore NF-Kb in assenza del gene *Nemo* endogeno. La trasfezione transiente è stata, quindi, eseguita

utilizzando i diversi plasmidi contenenti il cDNA murino del gene *Nemo* (sia nella forma Wt che mutata) sotto il controllo del promotore K-17, un plasmide *pRL-TK (Renilla reniformis)* (Promega, WI, USA) (Figura 12b) per la normalizzazione della trasfezione ed *NF-Kb Luciferase reporter vector* (Clontech Labs, CA, USA) (Figura 12c), per seguire l'attività del fattore trascrizionale in seguito ad over-espressione di *Nemo*. Le cellule sono state trasfettate in *Multiwell* a 24 pozzetti seguendo la procedura descritta in 4.2 e, dopo 44 ore di trasfezione, sono state stimulate per 4 ore con $TNF\alpha$, 50 ng/ml (Promega, WI, USA), noto in letteratura come attivatore del *pathway* di *NF-Kb*. Le cellule sono state, dunque, lavate con PBS e sottoposte ad un trattamento di lisi per l'estrazione delle proteine mediante il tampone di lisi "*Passive Lysis Buffer 1X*" (100 μ l), fornito dal kit "*Dual-Luciferase Reporter Assay System*" (Promega, WI, USA) utilizzato per i saggi di attività luciferasica. Le cellule trattate con il *Passive Lysis Buffer 1X* sono state raccolte in tubo ed incubate a temperatura ambiente per 15 minuti. 20 μ l di estratto proteico sono stati, dunque, trasferiti in *Multiwell* opache a 96 pozzetti per la lettura in luminometro *VICTOR^{2TM}* (PerkinElmer, MA, USA), della luciferasi *Firefly (Photinus pyralis)* e della *Renilla (Renilla reniformis)* in modo sequenziale mediante 100 μ l di *Luciferase Assay Reagent II (LARII)* e 100 μ l di *Stop & Glo Reagent*. Ogni punto sperimentale, in presenza o assenza di stimolo, è stato eseguito in duplicato.

4.4. Purificazione del costrutto per iniezione pronucleare

Il costrutto contenente il cDNA corrispondente alla forma *Nemo_C409R* (PT-K17_NemoC409R) è stato utilizzato per la

preparazione del modello murino transgenico. A tal fine, il vettore plamidico è stato linearizzato mediante digestione enzimatica con gli enzimi AseI ed XhoI in modo da isolarne solo la regione contenente K17 *promoter*-FLAG-Nemo_C409R. I prodotti di digestione sono stati separati su gel di agarosio mediante corsa elettroforetica e la banda di interesse è stata purificata mediante l'utilizzo del *kit QIAEXII* (Qiagen, CA, USA) in base alla procedura suggerita dalla casa produttrice. La regione plasmidica di interesse è stata, dunque, utilizzata per la generazione del topo transgenico tramite iniezione pronucleare eseguita dal *Darwin Transgenic Mouse Core, TX, USA*.

4.5. Genotipaggio

I modelli murini ottenuti in seguito all'iniezione pronucleare del transgene K17 *promoter*-FLAG-Nemo_C409R sono stati analizzati mediante genotipaggio del loro DNA genomico per verificare la presenza della regione di interesse inserita in modo casuale nel genoma.

Sono stati disegnati, pertanto, oligonucleotidi (senso: Fw Nemo_transgenic1 5'-GCCCACTGGCTGCCCTATAAAG-3'); antisenso: Rw Nemo_ transgenic1 5'-CGCTGGCTGACCTGGAAATG-3'), per amplificare, tramite PCR, una regione specifica di 385 nucleotidi all'interno del transgene. In particolare, le condizioni ottimali di amplificazione sono state determinate mediante PCR sul DNA relativo alla banda K17 *promoter*-FLAG-Nemo_C409R purificata in quantità scalari decrescenti e diluito in eccesso di DNA genomico totale (100ng). Per l'amplificazione è stato utilizzato l'enzima DNA polimerasi termostabile *AmpliTaq* (Applied Biosystem, CA, USA) e la reazione è

stata eseguita secondo il seguente protocollo: 30 cicli che includono 95°C per 30 secondi, 60 °C per 45 secondi, 72°C per 30 secondi; e infine una fase di estensione finale dei singoli prodotti di 72°C per 4 minuti. Le medesime condizioni di amplificazione sono state impiegate per il genotipaggio del DNA ottenuto, tramite l'utilizzo di *Blood and cell culture DNA mini kit* (Qiagen, CA, USA), da frammenti di tessuto di orecchio dei topi derivati dall'iniezione pronucleare.

I DNAs ottenuti sono stati saggiati in una reazione di PCR con oligonucleotidi specifici per una regione genomica del gene murino *Edar* (EDA receptor), oligonucleotide senso Fw 5'-AGTTCGGGAGCCCTTCAAATAG-3' ed oligonucleotide antisenso 5'-ATGGGTCTACGGAGAAGGCGAGCAG-3', in grado di amplificare un prodotto di 486 bp (Tm 62°C).

4.6. Programmi utilizzati

BLAST

Questo programma, disponibile in rete a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, consente di interrogare banche dati pubbliche per la ricerca di una data sequenza nucleotidica (*BLASTn*) o amminoacidica (*BLASTp*). Il programma, inoltre, permette di ricercare sequenze omologhe e/o identiche e di ottenere l'accesso di altre banche *in link*.

UCSC

Il database UCSC Genome Browser, disponibile in rete a <http://genome.ucsc.edu/>, contiene le sequenze di riferimento e gli

allineamenti per una varietà di genomi al fine di ottenere informazioni riguardo omologia di sequenza, pannelli di espressione genica, ESTs ed ulteriori informazioni su gruppi di geni relazionati tra loro.

VECTOR NTI

Il *software* bioinformatico Vector NTI, offerto da <http://www.invitrogen.com>, consente di creare, annotare ed analizzare sequenze di DNA e proteiche, preparare oligonucleotidi, analizzare siti di restrizione, visualizzare e modificare vettori ed allineare sequenze multiple.

5. Risultati

"Analisi di espressione di geni candidati target del pathway di EDA in cheratinociti primari di topo Wild-type e Tabby"

5.1. Analisi genotipica delle linee cellulari

Per determinare correttamente il genotipo dei due campioni di cheratinociti in esame, Wild-type e Tabby, il DNA genomico è stato estratto e sottoposto ad amplificazione, mediante PCR come descritto in Cui et al., 2006. In particolare, è stata amplificata una regione di 106 bp dell'esone 1 del gene *Eda* tramite oligonucleotidi specifici. Tale prodotto è stato, dunque, digerito mediante l'enzima di restrizione *DdeI*, al fine di discriminare i due campioni: nel caso del campione Wild-type, la presenza del sito di restrizione specifico per l'enzima, genera due prodotti di 55 e 51 bp (visibili come un'unica banda a circa 50 bp su gel di agarosio al 2%), mentre nel caso del campione Tabby l'assenza di tale sito permette l'identificazione della sola banda ad altezza 106 bp (Figura 13). Dopo aver caratterizzato geneticamente i due campioni biologici, questi sono stati sottoposti alle successive metodiche di analisi.



5.2. Analisi del profilo di espressione mediante microarrays

Prima di iniziare lo studio del profilo di espressione tra cheratinociti primari Wild-type e Tabby, è stata eseguita una Real-Time PCR per osservare il livello di espressione dei geni *Eda* ed *Edar*, al fine di confermare la presenza di entrambi i membri del *pathway*.

Tali geni risultano entrambi espressi nella linea cellulare Wild-type mentre il livello di espressione di *Eda* è significativamente *down-regolato* in cheratinociti Tabby (Figura 14). Il gene *Edar* risulta invece ugualmente espresso nei due campioni in esame mostrando una leggera *up-regolazione* nel campione Tabby (Figura 14). Tali risultati suggeriscono che il *pathway* EDA è attivo nei cheratinociti Wild-type e potrebbe essere innescato anche nei cheratinociti Tabby.

Analisi precedenti di *microarrays* su RNA dei due tipi di cheratinociti primari al passaggio IV di coltura, hanno condotto ad una lista di 385 geni la cui espressione risulta significativamente alterata (Allegato A). La lista include 208 geni *down-regolati* e 177 geni *up-regolati* in cheratinociti Tabby, pertanto, questi geni sono stati definiti come "candidati preliminari". Inoltre, il profilo di espressione di questi geni candidati è stato comparato a quello ottenuto *in vivo* mediante analisi di *microarrays* su RNA di pelle di topi adulti transgenici, in cui il gene *Eda-A1* risulta espresso ad elevati livelli (Cui et al., 2003; Cui et al., 2006). Con questa analisi, sono stati selezionati 38 di 385 geni iniziali, *up-regolati* di un valore ≥ 1.5 in presenza del transgene *Eda-A1* e *down-regolati* di un valore ≤ 1.5 quando il transgene non è espresso. I geni appartenenti a questo gruppo sono stati, pertanto, definiti come "geni candidati *target* di EDA" (Tabella 1) e sono stati classificati in base alla loro funzione, nota o probabile, comprendendo fattori di trascrizione, proteine di trasduzione del segnale ed inibitori di proteasi. Molti di questi geni non sono stati mai associati al *pathway* EDA in studi condotti in precedenza sulla pelle.

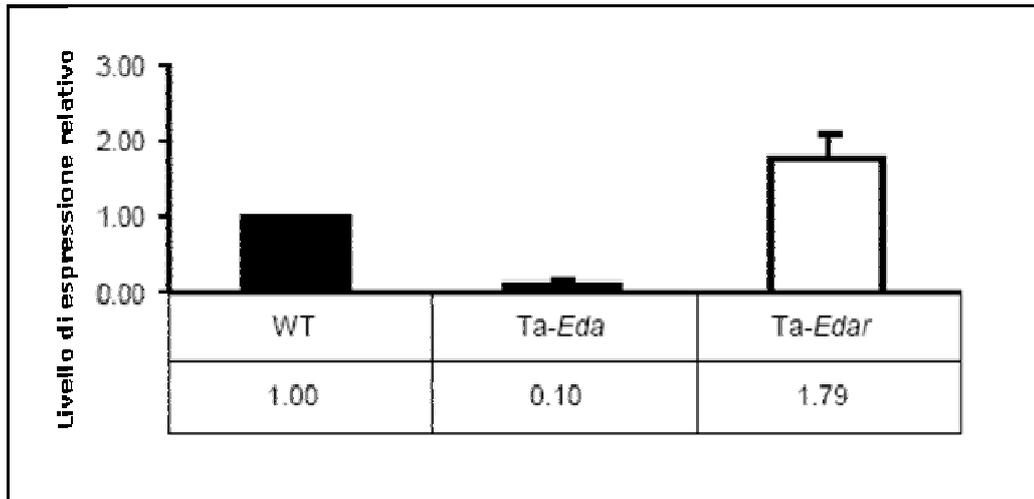


Figura 14: Analisi di espressione per i geni Eda ed Edar in cheratinociti primari di topi Wild-type (normalizzati ad un valore 1.0) e Tabby. *Eda* risulta significativamente *down*-regolato nel campione Tabby mentre *Edar* è *up*-regolato (Ta-Eda e Ta-Edar).

Tabella 1: geni "Candidati *target* di EDA" derivati dal profilo di espressione di cheratinociti primari.

Geni alterati	Variazioni di espressione in PK* (Ta/Wt)	Variazioni di espressione in pelle di WTTG (transgenico) (TG/WT)	Sublocalizzazione in pelle**	Referenze
Fattori trascrizionali				
<i>Tbx1</i>	0.1 ▼	2.0 ▲	ORS	Zoupa et al. 2006
<i>Tsc22d3</i>	2.2 ▲	0.3 ▼	n.d.	
<i>Ifi204</i>	2.3 ▲	0.6 ▼	n.d.	
Trasduttori di segnale				
<i>Bmp7</i>	0.1 ▼	1.5 ▲	Mx, DP	Rendl et al. 2005
<i>Ror2</i>	0.1 ▼	2.7 ▲	n.d.	Estrach et al. 2006
<i>Jag1</i>	0.4 ▼	1.6 ▲	Epi, ORS, Mx	
<i>Edn1</i>	0.4 ▼	1.6 ▲	Epi	Kim et al. 2007
<i>Inhba</i>	0.5 ▼	1.7 ▲	Epi, DP	Cruise et al. 2004; Nakamura et al. 2003
Citochine/Chinasi/Ormoni				
<i>Il23a</i>	0.2 ▼	2.5 ▲	Epi	Piskin et al. 2006
<i>Areg</i>	0.3 ▼	2.0 ▲	Epi	Yoshida et al. 2008
<i>Mark1</i>	0.4 ▼	1.9 ▲	n.d.	
<i>Nek6</i>	0.4 ▼	1.9 ▲	n.d.	
<i>Nppb</i>	0.4 ▼	1.7 ▲	n.d.	
Enzimi/Inibitori				
<i>Prss12</i>	0.1 ▼	2.1 ▲	DP	Rendl et al. 2005
<i>Pla2g7</i>	0.2 ▼	1.6 ▲	ORS	Rendl et al. 2005
<i>Stfa3</i>	0.2 ▼	2.1 ▲	ORS	Rendl et al. 2005
<i>Glul</i>	6.3 ▲	0.6 ▼	n.d.	
Trasportatori				
<i>Oabpl3</i>	0.4 ▼	1.6 ▲	n.d.	
<i>Slc16a6</i>	0.4 ▼	2.0 ▲	n.d.	
Proteine Zinc finger				
<i>Zfp518b</i>	0.4 ▼	1.6 ▲	n.d.	
<i>Zdhhc2</i>	2.5 ▲	0.4 ▼	n.d.	
<i>Fhl1</i>	9.6 ▲	0.6 ▼	n.d.	
Proteine che legano Ca ⁺⁺				
<i>S100a8</i>	0.3 ▼	7.0 ▲	Epi, Mdu	Schmidt et al. 2001
<i>Whrn</i>	0.3 ▼	2.0 ▲	n.d.	
<i>Pdzrn3</i>	0.4 ▼	1.7 ▲	n.d.	Tuhkanen et al. 1999
<i>Nrp2</i>	0.4 ▼	2.1 ▲	n.d.	
<i>Cd44</i>	0.4 ▼	1.7 ▲	Epi, DP	
<i>Tnnt2</i>	0.5 ▼	2.1 ▲	n.d.	Masunaga et al. 1995
<i>Ahnak</i>	2.1 ▲	0.5 ▼	Epi	
Tubuline/Ciclo cellulare/Heat shock				
<i>Tubb2a</i>	0.3 ▼	1.6 ▲	n.d.	
<i>Mad1l1</i>	0.4 ▼	1.6 ▲	n.d.	
<i>Dnaja1</i>	0.5 ▼	1.6 ▲	n.d.	
Funzione non nota				
<i>Palmd</i>	0.3 ▼	1.5 ▲	ORS	Rendl et al. 2005
<i>Ler5</i>	0.4 ▼	1.5 ▲	n.d.	
<i>Prkrip1</i>	0.5 ▼	1.6 ▲	n.d.	
<i>Herpud1</i>	2.4 ▲	0.6 ▼	n.d.	
<i>Arrdc3</i>	2.7 ▲	0.5 ▼	n.d.	
<i>0610010D20Rik</i>	3.4 ▲	0.5 ▼	n.d.	

*: ▼ e▲ rappresentano geni *up-* e *down-*regolati in cheratinociti Tabby o pelle di topi *Eda-A1* transgenici (WTTG) .

Il False Discovery Rate per i geni in lista è <0.01, corrispondente P-values <0.0005.

** : ORS, esterno al rivestimento della radice del follicolo pilifero (outer root sheath); Mx, matrice del follicolo pilifero ; DP, papilla dermica; Epi, epidermide; Mdu, medulla; n.d., nuovi geni identificati con sublocalizzazione incerta.

5.3. Conferma del profilo di espressione in cheratinociti tramite Q-PCR

Alcuni geni sono stati selezionati dai due gruppi, "candidati preliminari" e "geni candidati *target* di EDA", al fine di eseguire ulteriori analisi di espressione mediante la tecnica di Real-Time PCR. In particolare, dal gruppo di candidati preliminari, i geni: *Pitx1*, *Foxg1*, *Sox11* e *Plau*; dal gruppo di candidati *target*, i geni: *Tbx1*, *Bmp7*, *Jag1* e *Prss12*.

Esperimenti di Q-PCR eseguiti con sistemi *TaqMan*, come descritto in materiali e metodi 3.2., hanno confermato i risultati di *microarrays* per 7 di questi geni (*Tbx1*, *Bmp7*, *Jag1*, *Prss12*, *Pitx1*, *Foxg1* e *Plau*) (Figura 15). Il gene *Sox11*, invece, non è stato sufficientemente amplificato mediante Q-PCR e la sua espressione verrà analizzata solo a livello proteico (segue Western blotting).

Nonostante le differenze di espressione osservate tra i due campioni Wild-Type e Tabby, i segnali positivi di Q-PCR per la maggior parte dei geni analizzati sono stati osservati a circa 35 cicli piuttosto che 30 o meno, come di solito si verifica per geni altamente espressi. Ciò supporta l'ipotesi che geni espressi a bassi livelli possano essere monitorati in modo più efficiente in cheratinociti che in campioni di pelle totale in cui si può verificare una ulteriore diluizione dell'RNA di interesse.

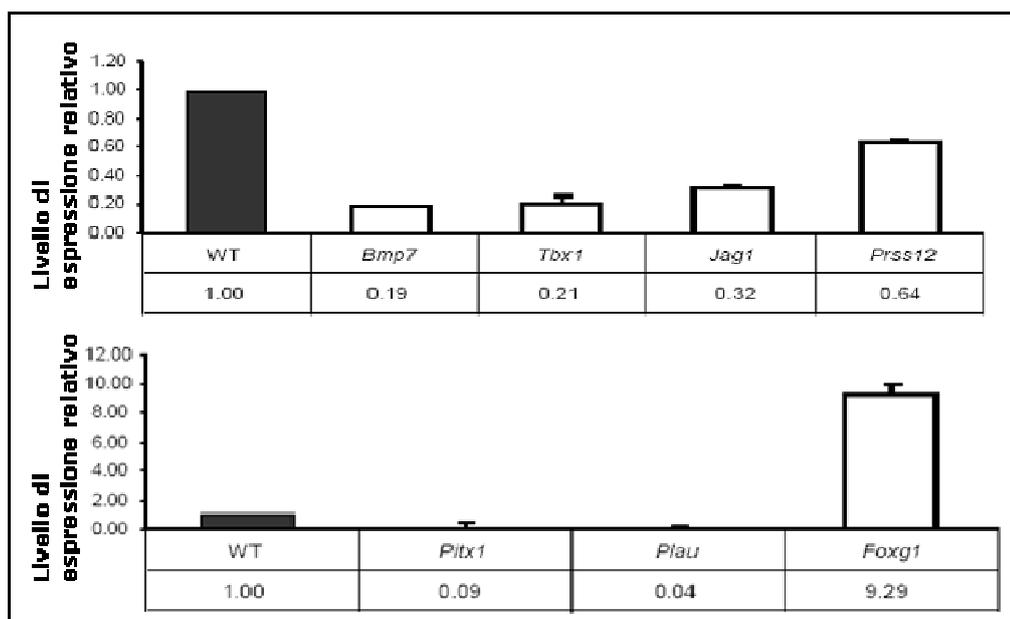


Figura 15: Livello di espressione relativo in cheratinociti primari per geni selezionati. I geni *Bmp7*, *Tbx1*, *Jag1* e *Prss12* (gruppo "geni candidati come target di EDA") sono significativamente *down*-regolati nel campione Tabby. I geni *Pitx1*, *Plau* e *Foxg1* (gruppo "candidati preliminari") presentano variazioni nel livello di espressione consistenti con i risultati di *microarrays*.

5.4. Analisi mediante Western blotting

Ulteriori analisi del livello di espressione sono state eseguite per valutare il prodotto proteico di alcuni dei geni in esame. In particolare, sono stati analizzati i livelli di espressione per *Pitx1* e *Sox11* del gruppo dei candidati preliminari e *Tbx1* del gruppo dei candidati *target* di EDA.

L'analisi mediante Western blotting sugli estratti proteici Ext.1 ed Ext.2 di cheratinociti primari Wild-type e Tabby, è stata eseguita mediante anticorpi specifici per i geni indicati, anti-PITX1, anti-TBX1 ed anti-SOX11 (Figura 16). Per il gene *Pitx1*, una debole banda di circa 40 KDa relativa al prodotto proteico, è stata osservata solo nel campione Wild-

type in entrambi gli estratti, mentre non è visibile nel campione Tabby. Nel caso del gene *Tbx1*, la banda del prodotto proteico di circa 50 KDa è presente, con maggiore intensità in entrambi gli estratti relativi al campione Wild-type, in particolare nell'estratto 2 (Figura 16). La banda proteica di SOX11 di circa 70 KDa, allo stesso modo, risulta più intensa negli estratti di campione Wild-type e, principalmente, nell'estratto proteico 2. In entrambe le frazioni proteiche relative al campione Tabby, SOX11, risulta poco rappresentato (Ext. 2) o totalmente assente (Ext. 1) (Figura 16). La normalizzazione della quantità di proteina analizzata su gel è stata eseguita mediante monitoraggio del gene *Actina β* tramite l'utilizzo dell'anticorpo anti-ACITNA β specifico. E' stata, dunque, osservata una significativa *down*-regolazione per i geni in esame nei campioni Tabby rispetto al Wild-Type confermando ulteriormente i risultati di Real-Time PCR e *microarrays*.

Al fine di verificare una possibile ri-attivazione del *pathway* e, quindi, dei geni analizzati e regolati dall'espressione del gene *Eda*, non è stato possibile introdurre in cheratinociti primari una copia del gene *Eda* in quanto, tali cellule risultano molto resistenti alle metodiche di trasfezione. E' stato, dunque, eseguito un trattamento diretto dei cheratinociti con la proteina solubile EDA-A1. Questa stimolazione non ha, però, prodotto alcuna variazione nell'espressione dei geni analizzati (dati non presentati) suggerendo una mancata attivazione del *pathway* nel sistema utilizzato. Come esperimento di controllo, pertanto, le cellule sono state stimulate con TNF α , noto attivatore del fattore trascrizionale NF-kB e, tramite Western blotting, e' stato monitorato il passaggio citoplasma-nucleo di NF-kB in seguito alla stimolazione. Mediante l'anticorpo specifico contro la subunità p65 di NF-kB, la

banda proteica di interesse, di circa 67 KDa, è stata rilevata nella frazione citoplasmatica in assenza di stimolazione e nella frazione nucleare dopo stimolazione (Figura 17). Mentre $TNF\alpha$ ha determinato una migrazione citoplasma-nucleo di NF- κ B, non è stata rilevata alcuna attivazione in seguito a stimolazione con la proteina ectodisplasina ricombinante (Figura 17), per motivi di scarsa multimerizzazione o modifiche post-traduzionali della proteina.

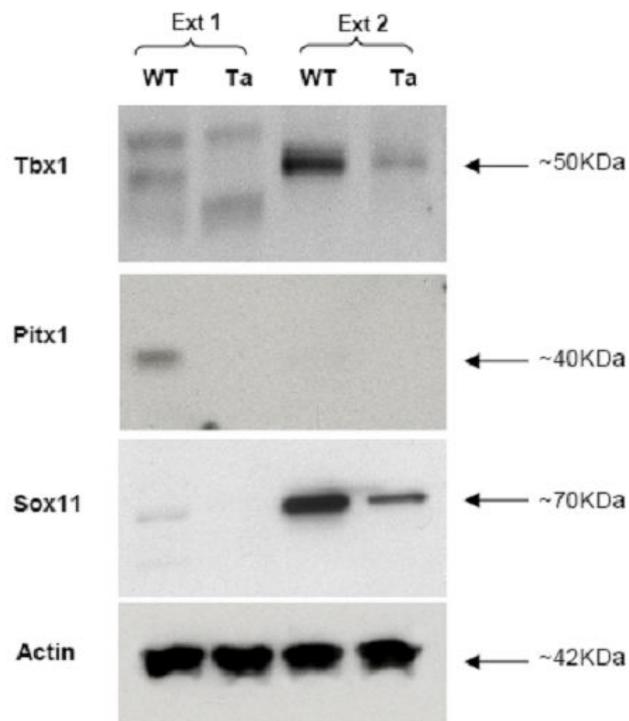


Figura 16: Western blotting su estratti proteici di cheratinociti primari Wild-type e Tabby. Le proteine TBX1, PITX1 e SOX11 risultano significativamente *down*-regolate nei due estratti Ext. 1 e 2. I campioni sono stati normalizzati con ACTINA.

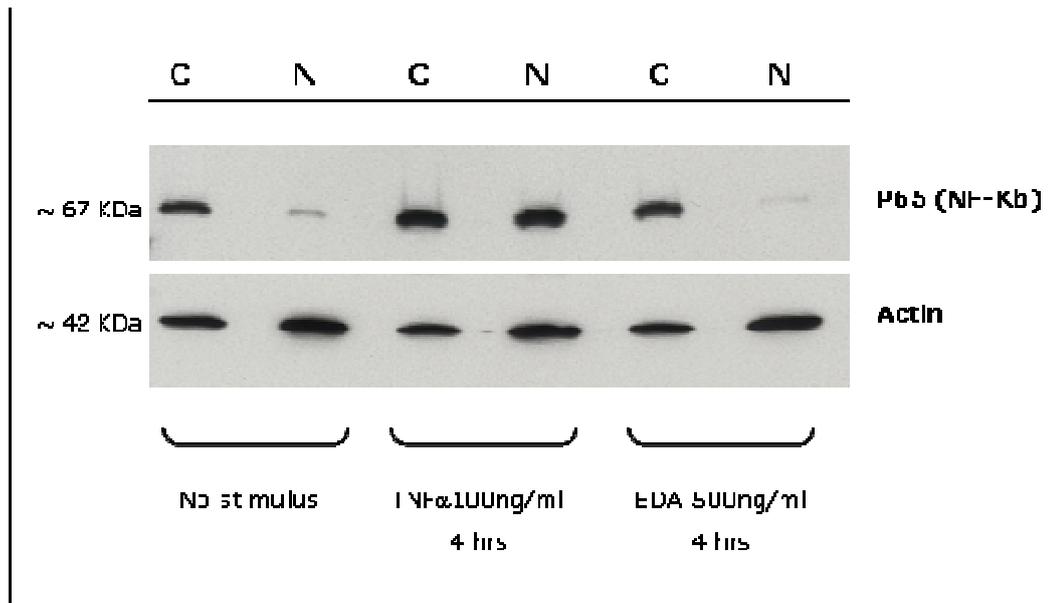


Figura 17: Analisi di attivazione di NF- κ B mediante proteina EDA ricombinante e TNF α . La banda proteica relativa alla subunità p65 di NF- κ B è visibile significativamente nella frazione nucleare solo in seguito a stimolazione con TNF α . La proteina EDA ricombinante, ottenuta da fonti commerciali, non induce il passaggio citoplasma-nucleo del fattore NF- κ B in cheratinociti primari. (C = Cytosol; N = Nucleus)

5.5. Analisi del profilo di espressione di geni selezionati su campioni di pelle totali Wild-type e Tabby tramite Q-PCR

Per analizzare il profilo di espressione di geni selezionati sono state eseguite ulteriori Q-PCR su campioni *in vivo*, quali RNA di pelle di embrioni Wild-type e Tabby negli stadi 15.5, 16.5 e 18.5 e nel primo giorno postnatale (P1). In particolare, sono stati saggati i geni *Tbx1*, *Bmp7* e *Jag1* del gruppo dei geni "candidati *target* di EDA" ed i geni *Pitx1*, *Foxg1* e *Sox11*, del gruppo dei candidati preliminari.

Il gene *Tbx1* risulta leggermente *down*-regolato nello stadio E15.5 relativo al campione Tabby ed in modo più marcato negli stadi E16.5, 18.5 e P1 (Figura 18). Anche *Bmp7* risulta *down*-regolato in modo più significativo nei campioni Tabby negli stadi E16.5, 18.5 e P1

(Figura 18). *Jag1*, invece, risulta *down*-regolato nel campione Tabby E15.5, mentre, il suo livello di espressione risulta significativamente ridotto negli stadi E16.5 e P1, anche se risulta simile al campione Wild-type nello stadio E18.5 (Figura 18). Tali risultati confermano, dunque, un'alterazione dei geni in esame durante il periodo di sviluppo dei follicoli piliferi nel modello murino Tabby.

Al contrario, i 3 geni del gruppo dei candidati preliminari, chiaramente *down*-regolati nei cheratinociti analizzati, sono risultati poco espressi per essere monitorati in campioni di pelle totali (*Pitx1*) oppure non hanno rivelato differenze significative nel livello di espressione in comparazione al Wild-type (*Foxg1* e *Sox11*) (dati non presentati).

A tal proposito, saranno eseguite ulteriori analisi a carico dei geni appartenenti al gruppo dei candidati preliminari per verificare quali di essi siano significativamente influenzati da EDA nei campioni *in vivo*.

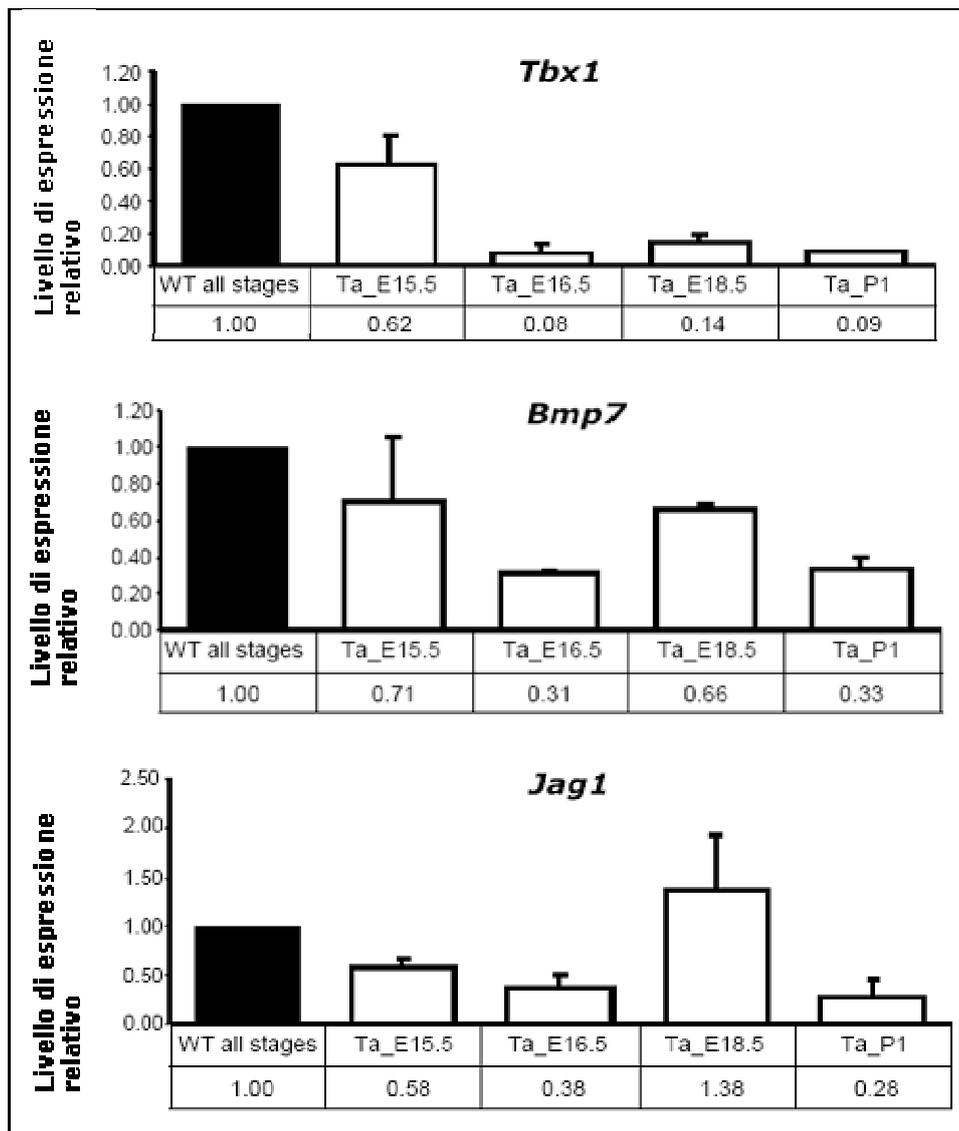


Figura 18: Livello di espressione relativo per *Tbx1*, *Bmp7* e *Jag1* in campioni di pelle negli stadi E15.5, 16.5, 18.5 e giorno 1 post-nascita. Il campione Wild-type è stato normalizzato ad un valore 1.0. *Tbx1* risulta leggermente *down*-regolato nel campione Tabby E15.5 e significativamente dopo. *Bmp7* è maggiormente *down*-regolato nel campione Tabby E16.5 e dopo. *Jag1* è presente a livelli simili nei campioni Wild-type e Tabby E18.5 ma è *down*-regolato negli altri stadi.

Allegato A: Geni espressi diversamente in cheratinociti primari di topi Wild-type e Tabby

Gene	Accession number	variazioni di espressione (Ta/WT)
Ccl2	NM_011333.2	0.01892
Prss12	NM_008939.1	0.04038
Nuak1	NM_001004363.1	0.07614
Bmp7	NM_007557.2	0.07982
Tbx1	NM_011532.1	0.10347
Slc38a4	NM_027052.2	0.10535
Cxcl1	NM_008176.1	0.10861
Nexn		0.11632
Rgs17	NM_019958.2	0.12065
Akr1c13	NM_013778.1	0.12495
Ror2	NM_013846.3	0.12768
Cxcl5	NM_009141.2	0.13116
Klhl23	NM_177784.2	0.13978
Pbp2	NM_029595.2	0.14552
Dhh	NM_007857.2	0.14695
Krt7	NM_033073.2	0.14912
Il23a	NM_031252.1	0.15403
Sncg	NM_011430.1	0.16017
Moxd1	NM_021509.3	0.16057
Col8a1	NM_007739.2	0.16113
5430435G22Rik	NM_145509.1	0.17231
Pla2g7	NM_013737.2	0.17271
Plau	NM_008873.2	0.17406
Serpine1	NM_008871.1	0.17544
Lmx1a	NM_033652.2	0.18333
Cyp3a13	NM_007819.2	0.1863
Gpr133		0.18798
Prlpc4	NM_028477.1	0.1952
Speer3	NM_027650.1	0.19634
Tenc1	NM_153533.2	0.19803
Csta	NM_001033239.1	0.19811
Lmo1	NM_057173.1	0.20295
Ptgs2	NM_011198.3	0.20547
Prlpc2	NM_023332.2	0.21617
C3	NM_009778.1	0.21661
Stfa3	NM_025288.1	0.21886
Zfand2a	NM_133349.2	0.22224
Vegfc	NM_009506.2	0.22451
Scx	NM_198885.2	0.22763
Rdh10	NM_133832.2	0.23357
A330021E22Rik	NM_172447.1	0.23359
Ccdc102a	NM_001033533.1	0.23866
Ankk1	NM_172922.1	0.24312
C030027H14Rik		0.24632
Smurf1	NM_001038627.1	0.24935
Lgals1	NM_008495.2	0.24975
BC019731	NM_144914.2	0.25024
Prlpc1	NM_011167.1	0.25152
Akr1c12	NM_013777.2	0.25251

Prom1	NM_008935.1	0.25796
Sox11		0.26016
S100a8	NM_013650.2	0.26545
Cxcl14	NM_019568.2	0.27028
Ccdc68	NM_201362.1	0.27094
Wipi2		0.27283
Whrn	NM_001008791.1	0.28356
Nt5e	NM_011851.2	0.28423
Rab32	NM_026405.2	0.29101
Micall2	NM_174850.2	0.29128
Ctnnal1	NM_018761.2	0.29353
Ivns1abp	NM_054102.2	0.29673
6330403L08Rik		0.29708
Areg	NM_009704.2	0.29985
OTTMUSG00000015762	NM_001039223.1	0.30093
1700125H20Rik		0.30178
Palmd	NM_023245.3	0.30858
Sema4c		0.31096
BC035537	NM_153535.1	0.31299
Tubb2a	NM_009450.1	0.31826
Abcb9	NM_019875.2	0.31962
Fndc4	NM_022424.3	0.32126
Zfp68	NM_013844.2	0.32132
Usp42	NM_029749.2	0.32381
Ctgf	NM_010217.1	0.32386
Ikbke	NM_019777.2	0.33095
Cyba	NM_007806.1	0.33452
Crhr1	NM_007762.2	0.33455
Ereg	NM_007950.2	0.34065
2900046G09Rik	NM_133778.1	0.34925
B130019G13Rik		0.35076
Slitrk6	NM_175499.2	0.35209
Pdzn3	NM_018884.1	0.35333
Plscr1	NM_011636.1	0.3538
Flrt2		0.35726
Abtb2	NM_178890.3	0.36099
Mark1	NM_145515.1	0.36167
Nek6	NM_021606.2	0.36169
Cacng6	NM_133183.1	0.36278
Endod1	NM_028013.1	0.36374
LOC434205		0.36621
6820424L24Rik		0.36732
Hrasls3	NM_139269.2	0.36789
Ier5	NM_010500.1	0.36905
Antxr2	NM_133738.1	0.37018
Irg1		0.37113
Il1a	NM_010554.4	0.3714
Eif2s3y	NM_012011.1	0.37361
1810014B01Rik		0.37506
Xlr4b	NM_021365.1	0.37639
Relb	NM_009046.2	0.37711
LOC433886	NM_001007590.2	0.37757
Cited2	NM_010828.2	0.37808
BC025575	NM_199200.2	0.3819
Nppb	NM_008726.2	0.38278
3110004L20Rik	NM_001033167.1	0.38401

Lrrc8c		0.3847
Tmprss4	NM_145403.2	0.38488
Col16a1	NM_028266.3	0.38522
Nat8l	NM_001001985.2	0.38568
Lrig1	NM_008377.2	0.3903
Sh3bp2	NM_011893.2	0.39048
Rab6b	NM_173781.4	0.39288
Lrrc8d	NM_178701.2	0.39331
Arpc1b	NM_023142.1	0.3943
Jag1	NM_013822.2	0.39718
Nanos1	NM_178421.3	0.39998
Hmha1	NM_027521.2	0.4011
Tmem16a	NM_178642.3	0.40192
Cdkn2b	NM_007670.3	0.4031
Mmp10	NM_019471.2	0.40352
Sgcb	NM_011890.3	0.40505
BC056923	NM_173395.1	0.40744
Thbs1	NM_011580.3	0.40942
Speer6-ps1		0.41573
Pdgfa	NM_008808.3	0.41757
Bri3	NM_018772.2	0.41867
Sgcb	NM_011890.3	0.41868
LOC671973		0.41897
Ddah2	NM_016765.2	0.41941
Cxcr7	NM_007722.2	0.42036
Nhsl1	NM_173390.2	0.42069
Nfkbiz	NM_030612.1	0.42165
Edn1	NM_010104.2	0.4232
2810453I06Rik	NM_026050.1	0.42331
Tead2	NM_011565.2	0.4242
2600003E23Rik	NM_027373.2	0.42594
Mad11l	NM_010752.3	0.42601
St3gal5	NM_001035228.1	0.42602
Dcun1d4	NM_178896.2	0.42764
Nrp2	NM_001077403.1	0.42935
2610203C20Rik	NM_001033153.1	0.42945
Ptpn12	NM_011203.2	0.43006
Gpsm1	NM_153410.2	0.43015
Ccng2	NM_007635.2	0.43094
Osbpl3	NM_027881.1	0.43169
Klhl22	NM_145479.2	0.4323
Glt8d3	NM_001033275.1	0.43561
Qk	NM_021881.1	0.43633
Tsga10ip		0.43814
F2r	NM_010169.2	0.43854
Wnt7a	NM_009527.2	0.43892
Pnrc1	NM_001033225.2	0.44123
Cd44	NM_009851.2	0.44335
Shb		0.4446
Slc16a6	NM_001029842.1	0.4455
Steap2		0.4459
Klf4	NM_010637.1	0.44979
Phldb1	NM_153537.3	0.45043
Inhba	NM_008380.1	0.45061
Cabp4	NM_144532.2	0.45115
Fst		0.45177

Tnni2	NM_009405.2	0.45377
Tnnt2	NM_011619.1	0.45646
Vamp5	NM_016872.2	0.45941
BC004044	NM_030565.5	0.46081
Tmsb4x	NM_021278.2	0.46137
Zscan21	NM_001044703.1	0.46221
Zdhhc4	NM_028379.1	0.46405
Trim47	NM_172570.2	0.46578
AU022870	NM_177682.3	0.46612
Golph2	NM_001035122.2	0.46629
Arhgdig	NM_008113.3	0.4664
Adarb1	NM_001024837.1	0.46763
1110007C02Rik	NM_027923.1	0.46877
LOC636187		0.46993
4930535E21Rik		0.47018
Bri3bp	NM_029752.2	0.47027
Bambi-ps1		0.47028
Wfdc2	NM_026323.1	0.47195
Garnl3	NM_178888.3	0.47441
Rpl21	NM_019647.3	0.47445
Slc39a13	NM_026721.1	0.47533
Nedd9	NM_017464.2	0.47573
Odc1	NM_013614.1	0.47655
Cldn12	NM_022890.1	0.47664
Lrrc29		0.477
Tmtc2	NM_177368.4	0.47705
2810453I06Rik	NM_026050.1	0.4775
Dnaja1	NM_008298.2	0.48071
Tacstd1	NM_008532.2	0.48151
Gstk1	NM_029555.2	0.48181
Ly6c		0.48569
Trim2	NM_030706.1	0.48616
Znhit1	NM_027318.1	0.48953
Sart2	NM_172508.2	0.49086
B4galt2	NM_017377.4	0.49101
Suds3	NM_178622.3	0.49199
Prkrip1	NM_025774.1	0.49248
Dnajc2	NM_009584.1	0.49368
Nrbp2	NM_144847.1	0.49467
Igkv2-116		0.49523
Pscd3	NM_011182.2	0.49532
EG626549		0.49556
Klf6	NM_011803.2	0.49727
LOC671155		0.49731
1810011O10Rik	NM_026931.1	0.49819
Fgfrl1		0.49998
Eda	NM_010099.1	0.75537
Cyb5	NM_025797.1	20.001
Phtf1	NM_013629.1	200.081
2810055F11Rik	NM_026038.1	200.082
Atp5a1	NM_007505.1	200.411
LOC435640		200.646
Col4a1	NM_009931.1	200.859
Riok3	NM_024182.3	200.967
Ibrdc2		201.105
Gpr137b	NM_031999.1	201.126

Ndufa2	NM_010885.2	201.488
1700040I03Rik		201.532
Nr1h4	NM_009108.1	202.122
Snx2	NM_026386.1	202.207
Rcc2	NM_173867.1	202.976
Cpne2	NM_153507.2	203.391
Sh3tc2	NM_172628.2	203.778
Polr2a		204.273
Dixdc1	NM_178118.1	20.477
Suox	NM_173733.2	207.524
Prss16	NM_019429.1	208.001
Il1r1	NM_008362.2	208.258
Csnk1a1		208.372
Txnl1		208.582
Cpe	NM_013494.3	208.645
Etv6	NM_007961.3	208.653
S100a13	NM_009113.3	20.885
Pon3	NM_173006.1	209.131
Bmp8a	NM_007558.1	209.355
Recql	NM_023042.2	210.091
Hlf	NM_172563.2	21.024
Impa2	NM_053261.2	21.047
Polr2d	NM_027101.2	211.641
Gas2l3	NM_001033331.2	212.017
Nedd4l	NM_031881.1	213.713
Ahnak	NM_001039959.1	214.017
Cdh2	NM_007664.2	214.654
Krt78		215.459
EG433102		215.619
Car13	NM_024495.3	216.257
Aldh4a1	NM_175438.3	216.541
Notch1	NM_008714.2	216.807
Lrrfip1	NM_008515.1	217.193
Qpctl	NM_026111.3	218.681
Mpp7		218.693
Zw10	NM_012039.1	219.251
Yipf5	NM_023311.3	220.587
Hdac1	NM_008228.2	221.518
Dcp2		22.155
Naglu	NM_013792.1	221.611
Sec11c	NM_025468.1	221.867
Snx24	NM_029394.2	222.072
Akap13		223.066
Snx7		223.639
Hod	NM_175606.2	223.975
9330132E09Rik		225.215
C1qdc2	NM_026125.1	225.476
Tsc22d3	NM_001077364.1	227.013
2410008K03Rik	NM_028022.1	227.544
Mns1	NM_008613.1	2.277
Wnt10a	NM_009518.1	227.854
Fasn	NM_007988.3	228.322
Krt8		228.914
Arl4a	NM_001039515.1	229.718
Sfrs7	NM_146083.1	230.535
Fgfr2	NM_010207.2	230.677

Dnajb4	NM_025926.1	230.937
Scel	NM_022886.2	231.687
Cdc23	NM_178347.2	23.198
1110036O03Rik		232.486
Ifi204	NM_008329.2	232.784
Cdc25c	NM_009860.1	233.226
Fbxo8	NM_015791.2	233.528
Abcg2	NM_011920.3	233.837
Hoxa7	NM_010455.2	233.915
Plf2	NM_011118.1	237.061
Mt1	NM_013602.2	23.802
Azin1	NM_018745.2	239.162
Rnaseh2a	NM_027187.2	239.749
2310066E14Rik		239.904
2810433K01Rik	NM_025581.2	239.929
Ablim3	NM_198649.2	239.964
Zfp503	NM_145459.3	24.001
Ppl	NM_008909.2	240.299
Ostf1	NM_017375.1	240.901
Herpud1	NM_022331.1	240.946
Cd109	NM_153098.2	241.269
Dmxl1		241.421
Hexim1	NM_138753.1	241.667
Klra3	NM_010648.1	241.946
Mppe1		243.047
Tubd1	NM_019756.2	244.616
Fxyd4	NM_033648.1	246.055
Isoc1	NM_025478.3	246.175
Mrpplf4		247.841
4930534B04Rik	NM_181815.2	247.906
Rrm2	NM_009104.1	248.281
Scap	NM_001001144.1	248.597
Zdhhc2		249.377
D030068K23Rik		249.473
1810007E14Rik	NM_025308.1	253.038
5133400G04Rik	NM_029485.1	253.342
Arl6	NM_019665.2	253.586
Kif20a	NM_009004.2	255.444
Sgk	NM_011361.1	25.548
Ralb	NM_022327.3	255.714
Errfi1	NM_133753.1	255.831
Commd10	NM_178377.4	258.325
Pmp22	NM_008885.2	258.391
2810022L02Rik	NM_144882.2	259.189
0610010D24Rik		261.166
Fech	NM_007998.3	261.799
Gipc2	NM_016867.1	262.749
Galnt1		262.917
Prrc1	NM_028447.2	263.446
Crip1	NM_007763.2	264.439
Bhlhb9	NM_198161.1	265.609
Arrdc3	NM_001042591.1	26.636
Acp5	NM_007388.2	267.326
Rwdd3	NM_028456.1	271.443
Abi2	NM_198127.1	272.418
Grb10	NM_010345.3	273.923

Dym	NM_027727.2	27.599
Nsbp1	NM_016710.1	277.128
Slco3a1	NM_023908.2	279.025
Dsg2		282.208
Insl6	NM_013754.1	282.783
Stard4		289.496
Dedd2	NM_207677.3	290.663
Hsd17b4	NM_008292.2	29.524
Rb1	NM_009029.1	296.782
Mt2	NM_008630.1	304.705
Dapk2	NM_010019.2	306.773
Col11a1	NM_007729.1	307.652
Crabp1	NM_013496.1	309.038
Rab27a	NM_023635.2	30.913
Epha1	NM_023580.2	313.252
Acaa2	NM_177470.2	313.597
Gramd3	NM_026240.2	315.583
Cnksr3	NM_172546.1	318.771
Tbx15	NM_009323.1	319.035
Fkbp5	NM_010220.2	32.621
Tom11l	NM_028011.1	334.651
0610010D20Rik	NM_026152.1	335.789
Gpt2	NM_173866.1	340.382
Wnt4		345.983
Tspan6	NM_019656.2	350.548
Ccbe1	NM_178793.3	350.974
1190002H23Rik	NM_025427.1	357.413
Ero1lb	NM_026184.2	365.829
D6Mm5e	NM_033079.1	379.685
Pcdhb17	NM_053142.2	393.246
BC016495	NM_145497.1	416.716
Maf	NM_001025577.2	427.749
Egln3	NM_028133.1	439.376
Grhl1	NM_145890.1	444.634
St6gal1	NM_145933.3	454.808
Lgals7	NM_008496.4	482.741
Pfn2	NM_019410.2	492.021
Nmnat3	NM_144533.2	524.437
Serpinb9b	NM_011452.1	535.749
Defb1	NM_007843.2	541.477
Ctsc	NM_009982.2	564.351
Rnf43	NM_172448.1	591.596
Glul	NM_008131.3	629.733
Stard8	NM_199018.1	654.222
Cxcl7	NM_023785.1	660.846
Lonrf3	NM_028894.1	710.173
Id2	NM_010496.2	724.912
Gmfg	NM_001039192.1	765.731
Ctla2a	NM_007796.1	776.341
Cdkn1c	NM_009876.2	794.236
Foxg1	NM_008241.1	927.733
Fhl1	NM_001077361.1	960.557
Klrc2	NM_010653.2	963.084
Fabp4	NM_024406.1	1.274.633
Gldc	NM_138595.1	2.329.636
Spink8	NM_183136.2	8.127.169

6. Risultati

***"Studio del gene Nemo nella Displasia Ectodermica
Anidrotica con Immunodeficienza (EDA-ID)"***

6.1. Preparazione ed analisi del costrutto PT-K17-Nemo Wild-type e mutato

Per la preparazione di un vettore di espressione che contenesse il cDNA del gene *Nemo*, è stato utilizzato il vettore pTRE previa sostituzione del suo promotore CMV con il promotore murino tessuto specifico K-17 (cheratina 17) espresso principalmente a livello delle placche ectodermiche e, dunque, in cellule di annessi di origine epiteliale (Figura 19a) (Bianchi et al., 2005). In primo luogo, dunque, la regione promotrice K-17, che si estende per 1.9 Kb a monte del primo esone del gene (Figura 19b), è stata amplificata tramite PCR da DNA genomico murino con oligonucleotidi contenenti i siti di restrizione adatti all'inserimento in *frame* nel vettore.

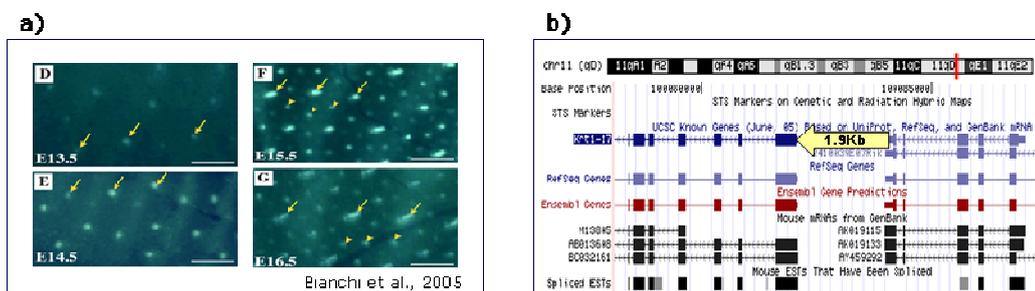


Figura 19: Promotore K-17. a) Analisi di espressione di K-17 mediante GFP in embrioni murini transgenici a diversi stadi. Le frecce e le puntine indicano rispettivamente placche ectodermiche primarie e secondarie. (Bianchi et al., 2005). b) Visualizzazione in UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) della regione promotrice di K-17 di 1.9 Kb a monte del primo esone.

Successivamente è stato inserito a valle di K-17, il cDNA di *Nemo* nella sua forma Wt o contenente una delle mutazioni riportate nei pazienti EDA-ID (Figura 20a): C409R (Cisteina-Arginina, sostituzione

nucleotidica 1225T>C; in uomo C417R, sostituzione nucleotidica 1249T>C) che causa destabilizzazione del dominio *Zinc Finger* del prodotto proteico (Jain et al. 2001) (Figura 20b) e A282G (Alanina-Glicina, sostituzione nucleotidica 839C>G; in uomo A288G, sostituzione nucleotidica 863C>G) che influenza la capacità del prodotto proteico di oligomerizzare (Vinolo et al., 2005) (Figura 20b), oppure, la mutazione *ex-novo* Δ ZnF, una delezione del dominio *Zinc Finger* C-terminale della proteina (Figura 20b) (sono stati deleti 22 amminoacidi del dominio *Zinc Finger* e 12 amminoacidi precedenti il dominio). L'amplificazione di tali cDNAs è stata eseguita, come descritto in Materiali e Metodi 4.1, tramite PCR su DNA miniprep del clone plasmidico BC021431 con oligonucleotidi specifici per l'inserimento unidirezionale ed *in frame* di ciascun frammento e contenenti la sequenza per il FLAG tag e la sequenza Kozac.

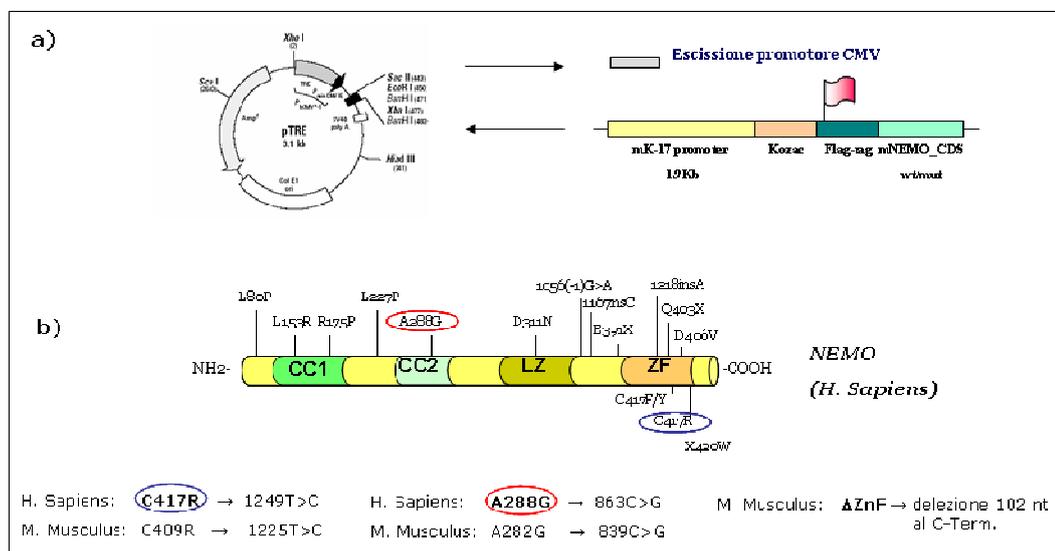


Figura 20: Preparazione dei costrutti PT-K17_NemoWt e Nemo mutato. a) Clonaggio del promotore K-17 e CDS_Nemo (wt e mutante) in pTRE modificato (privo di CMV). **b)** Struttura schematica della proteina NEMO ed alcune mutazioni umane EDA-ID. In dettaglio sono riportate le mutazioni (esistenti ed *ex-novo*) scelte per il modello murino e la loro posizione sul trascritto umano e murino.

I costrutti così preparati, PT-K17_NemoWt, PT-K17_NemoC409R, PT-K17_NemoA282G (contenenti la regione ORF_ *Nemo* completa; 1235 nt) e PT-K17_Nemo Δ ZnF (contenenti la regione ORF_ *Nemo* priva del dominio *Zinc Finger* C-terminale; 1133 nt) sono stati verificati mediante digestione ed analisi di sequenza ed impiegati, successivamente, in esperimenti di trasfezione transiente in cellule 293H e MEF *Nemo*^{-/-}.

La verifica del prodotto proteico ottenuto in seguito a trasfezione nelle due linee cellulari è stata eseguita mediante analisi di Western blotting utilizzando diversi anticorpi, uno diretto contro il FLAG *tag* (solo per cellule 293H) ed uno diretto contro *NEMO* (per entrambe le linee 293H e MEF *Nemo*^{-/-}). Il saggio degli estratti proteici ha rivelato la presenza della proteina di circa 48 KDa, corrispondente alla proteina completa NEMO Wt, C409R e A282G (Figura 21). Nel caso della forma di NEMO Δ ZnF, invece, è stata rilevata una banda di dimensioni minori di circa 44 KDa (Figura 21). In ogni caso è stato osservato un livello di espressione paragonabile per le varie forme proteiche analizzate, per cui tali mutazioni si prestano al proseguimento delle procedure sperimentali atte a creare il modello dominante negativo.

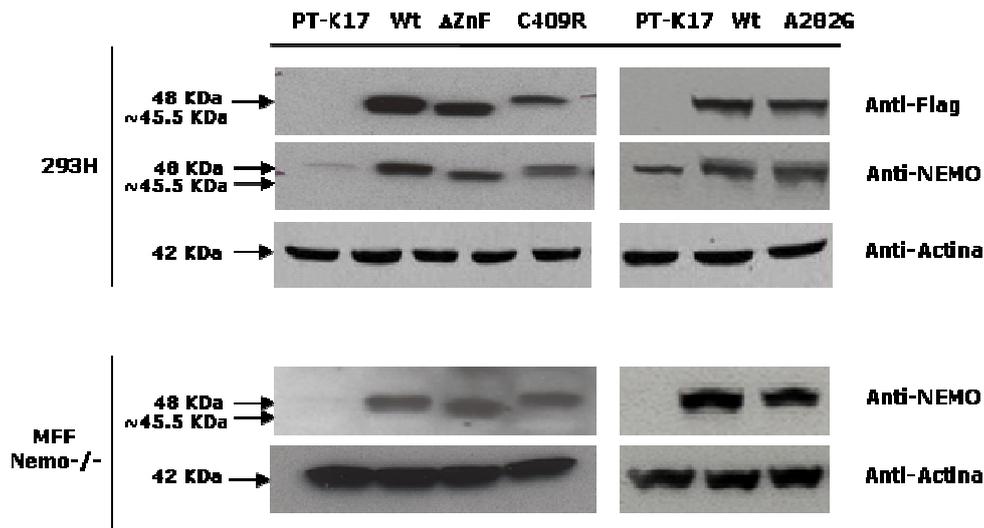


Figura 21: Analisi dei costrutti K-17_Flag_Nemo Wt e mutante tramite Western Blotting. L'analisi di espressione proteica dei diversi costrutti è stata eseguita con anticorpi anti-FLAG ed anti-NEMO in cellule 293H e solo con anti-NEMO in MEF *Nemo*^{-/-}. In ogni caso è stata rilevata la proteina di circa 48 KDa, corrispondente alla proteina completa NEMO Wt, C409R e A282G, mentre, la forma di NEMO Δ ZnF è visibile come banda di circa 44 KDa. La quantità degli estratti proteici caricati è stata normalizzata con anti-Actina.

6.2. Saggi di attivazione del fattore NF-Kb mediante Luciferasi

Per rilevare variazioni nell'attività del fattore trascrizionale NF-Kb attivato a valle del *pathway* EDA-NEMO, sono stati eseguiti saggi di luciferasi. Sono state, pertanto, co-trasfettate in modo transiente cellule 293H e MEF *Nemo*^{-/-} utilizzando uno dei plasmidi preparati (PT-K17_NemoWt, PT-K17_NemoC409R, PT-K17_NemoA282G, PT-K17_Nemo Δ ZnF), il plasmide *pRL-TK (Renilla reniformis)* ed il plasmide *NF-Kb Luciferase reporter vector*. Dopo 44 ore di trasfezione, le cellule sono state stimulate per 4 ore con $\text{TNF}\alpha$ 50ng/ml ed è stato eseguito il saggio di attività luciferasica. Nel caso delle cellule 293H, i risultati probabilmente sono influenzati dal *background* determinato dalla presenza della copia endogena del gene *NEMO* (Figura 22a) e, pertanto, in seguito a stimolazione con $\text{TNF}\alpha$, contrariamente al

risultato atteso, e' stata osservata una inibizione dell'attività del fattore NF-kB, anche nel campione contenente la copia Wt, rispetto al campione trasfettato con il vettore vuoto (PT-K17) (Figura 22a). La linea cellulare 293H, dunque, non rappresenta una sistema corretto per questo tipo di analisi, in quanto la presenza del gene *NEMO* endogeno altera i risultati relativi alla copia di *Nemo* murina introdotta mediante trasfezione. L'utilizzo di cellule MEF *Nemo*^{-/-} ha permesso, dunque, di osservare l'attività del fattore NF-kB in assenza del gene *Nemo* endogeno. I risultati ottenuti in tal caso mostrano una riduzione dell'attività del fattore *NF-kB*, in seguito a stimolazione con TNF α 50ng/ml in presenza del cDNA di *Nemo* mutato (Figura 22b).

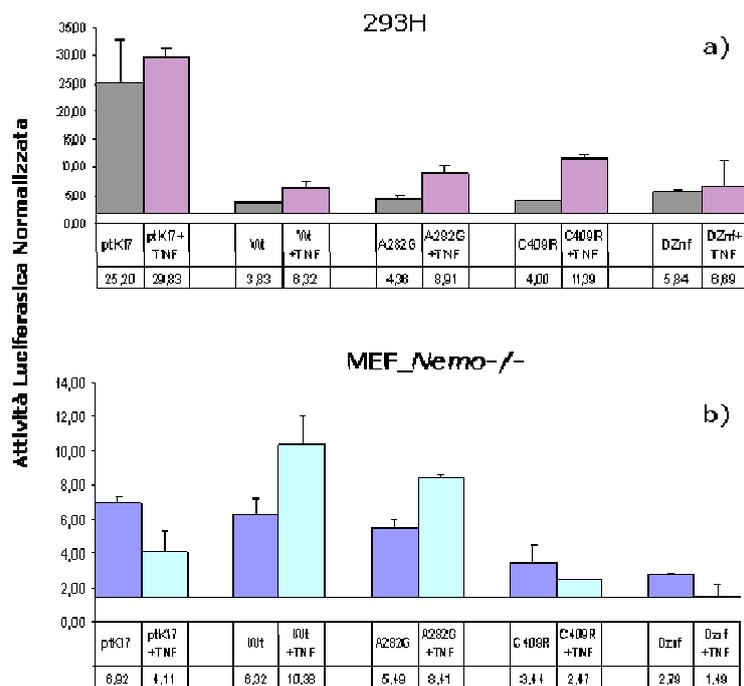


Figura 22: Saggi di attivazione del fattore NF-Kb mediante Luciferasi. Cellule 293H **(a)** e MEF_*Nemo*^{-/-} **(b)** sono state co-trasfettate in modo transiente con il plasmide *reporter NF-Kb/Luciferasi*, il plasmide *pRL-TK* per la normalizzazione ed un plasmide codificante la forma di NEMO Wt o mutato (A282G, C409R e Δ ZnF). L'attività di NF-kB è valutata in base alla *ratio* luc:renilla sia in assenza di stimolo che dopo trattamento con TNF α (4 ore, 50ng/ml). **a)** La diminuzione di attività luciferasica osservata in cellule 293H in presenza di plasmidi contenenti le varie forme di *Nemo*, potrebbe essere dovuta ad effetti di *background* dipendenti da NEMO endogeno. **b)** Il pannello di attività luciferasica per la linea MEF_*Nemo*^{-/-} mostra una riduzione di attività di NF-kB principalmente in presenza di NEMO C409R e Δ ZnF.

In particolare, osservando in percentuale in valori di attivazione di NF- κ B dopo stimolazione, la mutazione A282G (A288G in uomo) attiva il fattore *NF-Kb* per l'81%, la mutazione C409R (C417R in uomo) per il 24%, la mutazione *ex-novo* Δ ZnF (delezione del dominio *Zinc Finger*) per il 15% (Figura 23).

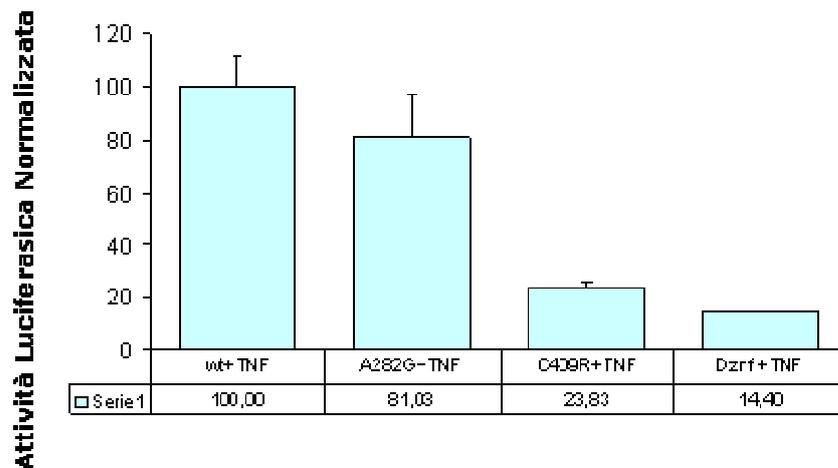


Figura 23: Valori percentuali di attività NF- κ B-luciferasica dopo stimolazione con TNF α in cellule MEF_ *Nemo*./-.

6.3. Preparazione del topo transgenico ed analisi genotipica

Tra le mutazioni analizzate, C409R risulta essere presente, nella sua forma umana C417R, in 6 pazienti affetti da EDA-ID (Ku et al., 2005) ed e' stata scelta, pertanto, come buona candidata per la preparazione del topo transgenico.

Il costrutto contenente il cDNA corrispondente alla mutazione di interesse è stato, quindi, impiegato nella tecnica di purificazione specifica per consentirne l'utilizzo nella tecnica di iniezione pronucleare in oociti fecondati murini.

Il vettore PT-K17_NemoC409R è stato, dunque, linearizzato mediante digestione enzimatica, al fine di isolarne solo la regione contenente il promotore K-17, il FLAG *tag* e la ORF_NemoC409R (3842 bp) (Figura 24a). La banda relativa a tale regione è stata separata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio, purificata ed utilizzata per la preparazione del topo transgenico presso il *Darwin Transgenic Mouse Core, TX, USA*.

Con questa metodica, sono nati 20 topi albi (*FVB*) il cui DNA, ottenuto da frammenti di orecchio, e' stato testato per la presenza del transgene.

A tal fine, sono stati disegnati oligonucleotidi specifici, come descritto in Materiali e Metodi 4.5, per amplificare una piccola porzione di 385 nucleotidi all'interno del transgene inserito (Figura 24a).

Gli oligonucleotidi sono stati, dunque, impiegati per determinare le condizioni ottimali di reazione utilizzando il DNA relativo alla banda K17 *promoter*-FLAG-Nemo_C409R purificata, in quantità decrescenti e diluito in un eccesso di DNA genomico totale (100ng) (Figura 24b).

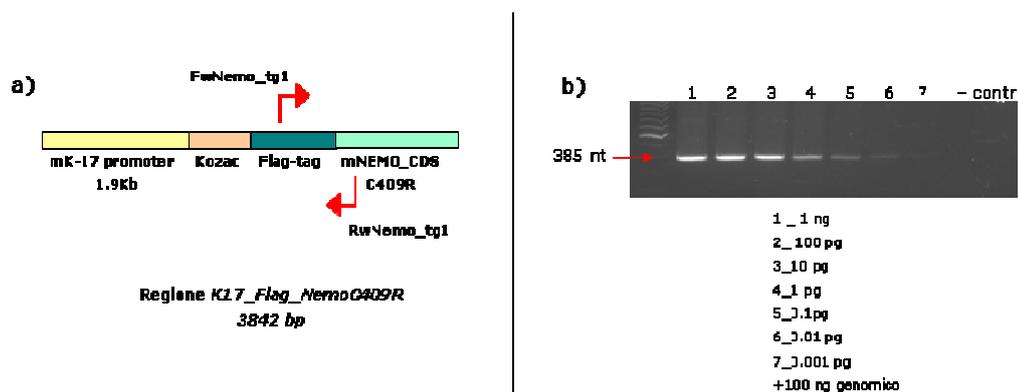


Figura 24: Preparazione del costrutto di iniezione pronucleare. a) Regione plasmidica *K17 promoter_FLAG_NemoC409R* isolata mediante digestione enzimatica e purificata per l'iniezione atta alla preparazione del topo transgenico. Le frecce indicano gli oligonucleotidi specifici (*Fw Nemo_transgenic1*; *Rw Nemo_transgenic1*) disegnati per amplificare 385 bp all'interno del transgene. **b)** Elettroforesi su gel di agarosio di prodotti di PCR relativi alla banda purificata *K17promoter_Flag_NemoC409R* in concentrazioni decrescenti e diluita in 100ng di DNA genomico totale murino.

Dopo aver messo a punto le condizioni di reazione il DNA genomico dei topi ottenuti è stato analizzato per la presenza del transgene e sono stati identificati 10 topi positivi alla presenza del transgene (Figura 25). La qualità del DNA è stata verificata tramite PCR con oligonucleotidi specifici per il gene *Edar*.

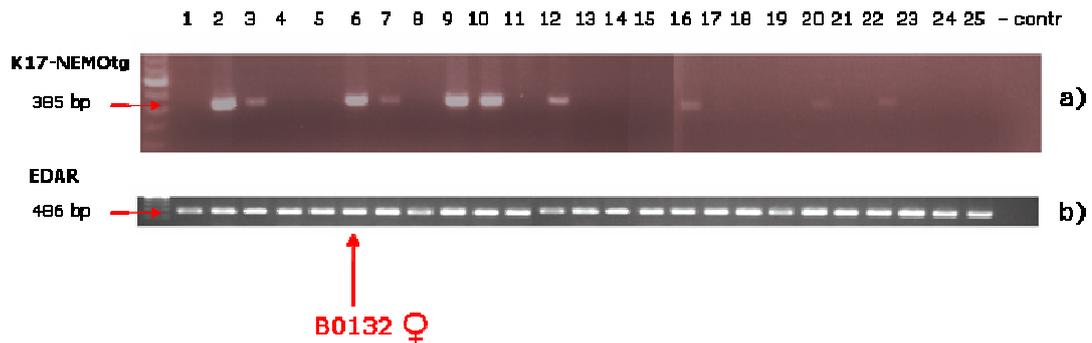


Figura 25: Analisi genotipica dei topi K17-NEMO Tg C417R. a) Elettroforesi su gel di agarosio di prodotti di PCR relativi alla banda K17 promoter_FLAG_NemoC409R presente come transgene nel DNA di topi analizzati. **b)** Normalizzazione del DNA mediante PCR con oligonucleotidi specifici per il gene *Edar*. In evidenza il campione B0132 con fenotipo diverso se paragonato al Wt.

I topi positivi alla presenza del transgene, sono stati analizzati preliminarmente a livello fenotipico al fine di osservare alterazioni a carico del mantello e/o altri annessi epidermici. In particolare, il topo femmina n. B0132, riportato in Figura 26 (genotipo in Figura 25), presenta una tipologia di mantello leggermente anormale se comparato ai topi Wild-type negativi alla presenza del transgene. Il pelo di tale campione murino non è stato analizzato microscopicamente per valutare la presenza dei vari sottotipi di pelo (*Guard*, *Awl* e *Zigzag*) e non si osservano particolari alterazioni a carico di peli della coda e delle zampe o a carico delle vibrisse. Il mantello sembra essere più diradato lungo il corpo dell'animale

suggerendo possibili zone di alopecia da analizzare successivamente a livello microscopico (Figura 26). Questo particolare fenotipo individuato in un'osservazione preliminare potrebbe essere relazionato alla presenza del gene *Nemo* mutato sotto il controllo del promotore specifico K-17, suggerendo una correlazione con il fenotipo del modello murino Tabby.

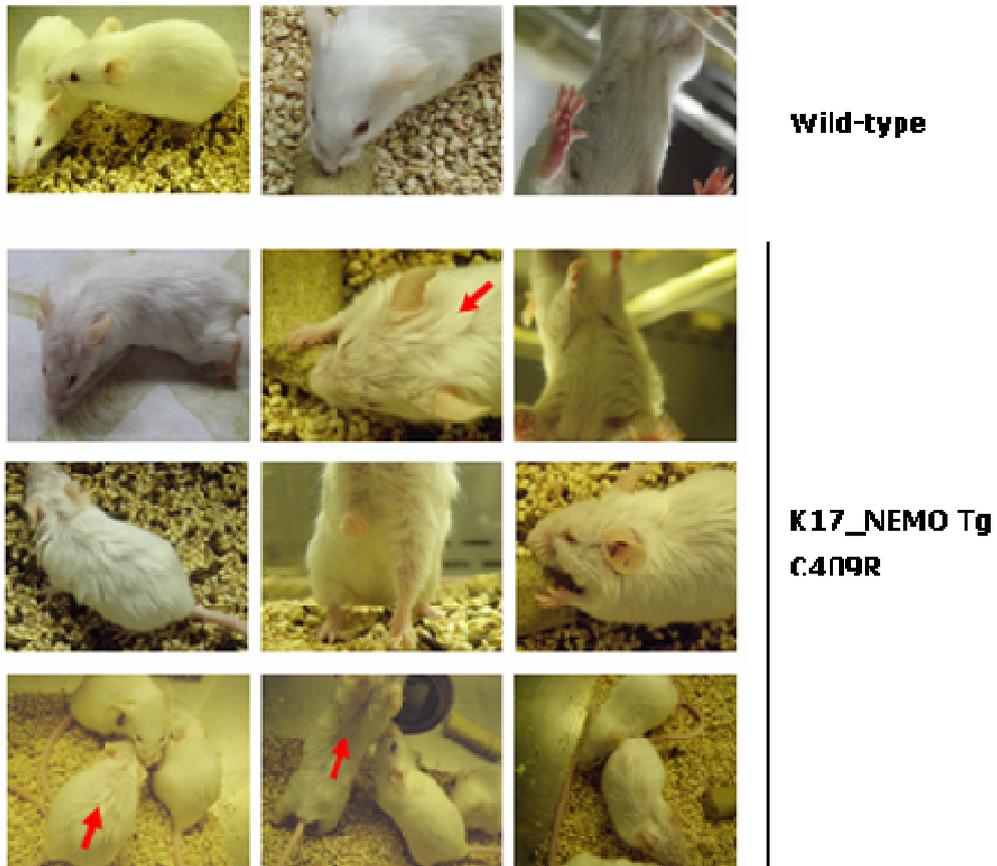


Figura 26: Preliminare osservazione fenotipica del modello murino B0132 positivo per il transgene K17-NEMO Tg C409R. Una prima analisi dei vari topi positivi alla presenza del transgene rivela un fenotipo peculiare solo nel caso del campione B0132. Rispetto ai fenotipi dei topi Wt, infatti, questo campione presenta alcune anomalie nel mantello quali possibili zone di alopecia maggiormente visibili su capo e dorso del corpo (frecce rosse).

Discussione

La Displasia Ectodermica Anidrotica rappresenta la forma più comune tra le Displasie Ectodermiche con malformazioni a carico di ghiandole sudoripare, follicoli piliferi e denti in pazienti umani e modelli animali (Cui e Schlessinger, 2006). La patologia è causata da mutazioni a carico di vari membri del *pathway* EDA che include *EDA*, *EDAR* ed *EDARADD*, una nuova sottofamiglia TNF che regola lo sviluppo di annessi epidermici tramite l'attivazione di NF-κB. Inoltre, mutazioni in *NEMO*, *NF-κB*, *TRAF6* e *IκBa* determinano la patologia EDA associata a disturbi del sistema immunitario (Doffinger et al., 2001; Naito et al., 2002; Courtois et al., 2003). La regolazione del *pathway* EDA è molto complessa e, nonostante alcune molecole siano state individuate come regolatori ed effettori, il pannello completo dei *targets* molecolari è ancora incompleto. Geni individuati appartenenti ai *pathways* SHH, WNT/DKK, BMP e LTβ, infatti, intervengono negli stadi embrionali precoci nella regolazione dello sviluppo degli annessi epidermici e, in stadi più avanzati, nella determinazione del sottotipo di pelo (Cui e Schlessinger, 2006).

Alcuni geni *target* nel *pathway* di EDA sono già stati individuati comparando profili di espressione di RNA di pelle di topi Wild-type e topi mutanti per *Eda* (Tabby). L'espressione di geni associati ad EDA è, però, ristretta all'epidermide ed alla parte epidermica degli annessi della pelle, ma l'epidermide rappresenta solo 1/10 di tutta la pelle, quindi, è probabile che l'RNA di alcuni geni effettori di EDA venga diluito nell'RNA totale utilizzato risultando in concentrazioni troppo basse per essere monitorato. In aggiunta, la pelle totale non è facilmente manipolabile per studi del *pathway* EDA *in vitro*.

Pertanto, nella prima parte di questo dottorato di ricerca, cheratinociti primari di topi Wild-type e Tabby sono stati utilizzati, quali possibile modello cellulare per estendere i risultati ottenuti su campioni totali di pelle ed evidenziare nuovi effettori del *pathway* EDA. Analisi di *microarrays* su RNA di tali cheratinociti ha rivelato 385 geni significativamente alterati (208 geni *down*-regolati, 177 geni *up*-regolati) definiti come "candidati preliminari" (Allegato A). Questa lista di geni è stata ridotta in seguito alla comparazione tra profili di espressione eseguiti su cheratinociti e profili di espressione di RNA di pelle di topi adulti transgenici in cui il gene *Eda* è espresso ad alti livelli. 38 geni della lista, dunque, sono risultati *up*-regolati in presenza del transgene e *down*-regolati in sua assenza, pertanto, sono stati definiti come "geni candidati *target* di EDA" (Tabella 1). Alcuni geni appartenenti ai gruppi "candidati preliminari" (*Pitx1*, *Foxg1*, *Sox11* e *Plau*) e "geni candidati *target* di EDA" (*Tbx1*, *Bmp7*, *Jag1* e *Prss12*) sono stati analizzati mediante Real Time PCR per confermare i dati di *microarrays*. Tale lavoro ha confermato i risultati di *down*-regolazione per i geni *Pitx1*, *Plau*, *Tbx1*, *Bmp7*, *Jag1* e *Prss12* e di *up*-regolazione per *Foxg1*. Il gene *Sox11*, invece, non è stato amplificato sufficientemente nella metodica utilizzata. Questo studio di espressione è stato associato anche ad un'analisi del prodotto proteico mediante Western Blotting rivelando *down*-regolazione dei geni *Pitx1*, *Tbx1* e *Sox11* anche a livello proteico. Per accertare tali risultati con un'analisi *in vivo*, sono state eseguite ulteriori Real Time PCRs per i geni *Tbx1*, *Bmp7*, *Jag*, *Pitx1*, *Foxg1* e *Sox11*. L'analisi, condotta su RNA di pelle embrionale di topi Tabby negli stadi 15.5, 16.5, 18.5 e P1, ha evidenziato una *down*-regolazione stadio specifica per i geni *Tbx1*,

Jag1 e *Bmp7*, (appartenenti al gruppo "geni candidati *target* di EDA"), suggerendo un loro coinvolgimento nel periodo di formazione del follicolo pilifero nel modello murino Tabby. Il livello di espressione dei geni *Pitx1*, *Foxg1* e *Sox11* (appartenenti al gruppo "candidati preliminari"), nonostante sia stato confermato in esperimenti di Real Time PCR e/o Western Blotting su cheratinociti primari, non ha mostrato significative variazioni durante lo studio *in vivo* (*Foxg1* e *Sox11*) oppure la scarsa quantità di templatò non ne ha permesso l'analisi (*Pitx1*) (dati non presentati). Ciò indica la necessità di analizzare ulteriormente i geni del gruppo "candidati preliminari" per identificare con precisione altri possibili effettori realmente coinvolti nella risposta ad EDA *in vivo*.

L'analisi su cheratinociti primari ha, dunque, rivelato nuovi geni effettori candidati quali fattori di trascrizione e proteine di segnale coinvolti nel meccanismo d'azione di EDA.

Tbx1, membro della famiglia di fattori trascrizionali T-box, è coinvolto nello sviluppo di molti organi e recentemente è stato osservato un suo coinvolgimento nello sviluppo del follicolo pilifero e del dente nonostante la sua funzione non sia ancora chiara (Zoupa et al., 2006; Rendl et al., 2005). Inoltre, il profilo di espressione su pelle di topi Tabby negli stadi 16.5 e 18.5 eseguito da Cui et al., 2006, rivela una significativa *down*-regolazione di *Tbx1*, quindi, lo studio del presente dottorato conferma le variazioni di espressione *in vivo* ed *in vitro* tramite Real Time PCR e Western Blotting. La variazione di espressione di *Tbx1* in cheratinociti primari Tabby ed *in vivo*, dunque, ne suggerisce il probabile ruolo come *target* prossimale di EDA nello sviluppo di follicoli piliferi.

Il gene *Bmp7* è già stato associato allo sviluppo della placca ectodermica deputata alla formazione delle piume nella gallina (Harris et al., 2004) ed analisi di espressione ne hanno rivelato la presenza in topi nelle regioni della papilla dermica e della matrice epidermica del follicolo pilifero (Rendl et al., 2005). Inoltre, *Bmp7* risulta significativamente *up*-regolato in colture di pelle stimulate con ectodisplasina (Mou et al., 2006). Dunque, lavori riportati in letteratura hanno già evidenziato un possibile coinvolgimento di *Bmp7* nei processi di formazione di annessi epidermici malgrado studi di espressione presentati in Cui et al., 2006 su pelle totale di campioni Tabby, non abbiano rivelato variazioni di espressione significative. Il presente studio ha, però, permesso di valutare *Bmp7* come un probabile *target* di EDA suggerendo un nuovo possibile legame tra i *pathways* EDA e BMP.

Questa analisi, inoltre, suggerisce che il gene *Jag1*, ligando coinvolto nel *pathway* Notch, fattore critico degli stadi tardivi dello sviluppo del follicolo pilifero (Millar, 2002), è regolato dal *pathway* EDA con un meccanismo stadio-specifico. Questo risultato rappresenta la prima indicazione di una possibile interazione funzionale tra i *pathways* EDA e Notch.

I cheratinociti primari utilizzati in tale lavoro come modello *in vitro*, presentano alcune limitazioni intrinseche come eterogeneità, stato di differenziamento non ben definito e profilo di espressione genico che può variare rispetto ai campioni *in vivo*. Nonostante questi possibili svantaggi, tali cellule esprimono il recettore EDAR e permettono l'individuazione, con maggiore sensibilità, di nuovi *targets* di EDA espressi a bassi livelli nel tessuto epidermico.

Questo sistema rappresenta, dunque, un modello *in vitro* alternativo utile per definire maggiormente l'ampio spettro di effettori *downstream* del *pathway* EDA (Esibizione et al., 2008).

La seconda parte del lavoro di ricerca è basata sulla preparazione di un modello murino transgenico con over espressione del gene *Nemo*, coinvolto nel *pathway* EDA, per investigarne il ruolo nella forma EDA-ID.

NEMO è una subunità regolatoria del complesso IKK essenziale all'attivazione di NF- κ B e, mutazioni amorfe a carico del gene, con conseguente perdita di funzione, determinano l'*Incontinentia Pigmenti* (IP), patologia genetica *X-linked* dominante che comporta letalità embrionale nei maschi ed alterazioni cutanee, neurologiche ed oftalmologiche nelle femmine (Nenci et al., 2006; Zonana et al., 2000). La comune mutazione riscontrata nei pazienti IP, infatti, è un riarrangiamento del DNA genomico (delezione esoni 4-10) che causa troncamento della proteina e soppressione completa dell'attività di NF- κ B (Fusco et al., 2008). Nel caso della patologia EDA-ID il gene NEMO presenta mutazioni ipomorfiche missenso o piccole delezioni, principalmente nella regione del suo dominio *Zinc Finger*, che non aboliscono completamente la sua funzione. I pazienti EDA-ID presentano le tipiche alterazioni fenotipiche della Displasia Ectodermica Anidrotica (anodontia/ipodontia, atricosi/ipotricosi, pelle secca con anidrosi/ipoidrosi), talvolta in forma più lieve ed associate a ricorrenti infezioni del tratto respiratorio, digestivo e della pelle causate da batteri Gram + e -, micobatteri e vari virus (Ku et al., 2005; Macini et al., 2008).

Una mutazione nello *stop codon*, inoltre, causa una forma più severa di EDA-ID associata a linfedema ed osteopetrosi.

Tra le varie mutazioni EDA-ID a carico del gene *NEMO* sono state selezionate due mutazioni, A288G e C417R (in topo A282G e C409R rispettivamente), riportate in pazienti in letteratura ed una mutazione *ex-novo*, Δ ZnF (Delezione dominio *Zinc Finger*), ai fini della preparazione di costrutti plasmidici per consentire l'espressione in topo del gene mutato in modo epidermide-specifico grazie alla presenza del promotore K-17, analizzato in Bianchi et al., 2005. I promotori dei geni cheratinici, infatti, (ad esempio, K-14 e K-5) sono spesso utilizzati per la preparazione di modelli murini transgenici volti ad una maggiore comprensione dell'epidermide ed il gene K-17 risulta espresso specificamente a livello di cellule di annessi di origine epiteliale come follicoli piliferi, unghie, ghiandole e denti e viene regolato durante lo sviluppo dell'epitelio della pelle. Il promotore di K-17 murino rappresenta, dunque, un nuovo sistema per l'espressione preferenziale di un gene, a carico degli annessi della pelle (Bianchi et al., 2005).

L'espressione del transgene K-17-*Nemo*_mutato, nel modello murino, a livello dell'epidermide potrebbe determinare un fenotipo EDA senza immunodeficienza da comparare al fenotipo del modello murino della patologia, Tabby. Dunque, mediante clonaggio direzionale sono stati elaborati i costrutti plasmidici PT-K17_NemoWt, PT-K17_NemoC409R, PT-K17_NemoA282G, contenenti la regione ORF di *Nemo* completa Wild-type o mutata e PT-K17_Nemo Δ ZnF contenente la regione ORF di *Nemo* priva del dominio *Zinc Finger* finale. In ogni caso il cDNA di *Nemo* è situato a valle di un Flag tag. L'analisi dei costrutti, così preparati, mediante trasfezione transiente e Western Blotting su cellule

murine MEF (fibroblasti embrionali di topo) *Nemo*^{-/-} e cellule umane 293H, mediante l'utilizzo di anticorpi anti-Flag ed anti-NEMO, ha rivelato un livello di espressione paragonabile per le varie forme proteiche di NEMO in esame. Ciò ha suggerito la possibilità di impiego dei costrutti nella preparazione del topo transgenico.

Il livello di attivazione di NF- κ B, in presenza delle varie forme di *Nemo*, è stato valutato mediante saggi di luciferasi sia sulla linea cellulare 293H che MEF_*Nemo*^{-/-}, dopo stimolazione con TNF α , noto attivatore del *pathway*. In cellule MEF_*Nemo*^{-/-} la forma *Nemo*_A282G (A288G in uomo) ha determinato attivazione di NF- κ B per l'81%, la forma *Nemo*_C409R (C417R in uomo) per il 24% e la forma *Nemo*_ Δ ZnF per il 15%. Nel caso della linea 293H, tuttavia, i risultati suggeriscono una potenziale influenza da parte della copia endogena del gene *NEMO* che sembra determinare un'inibizione del *pathway* anche in presenza della forma *Nemo*_Wt suggerendo un eventuale meccanismo di *feedback* negativo del gene *NEMO*. Questa linea cellulare, pertanto, non è stata considerata, in tale situazione, un sistema adeguato per un'analisi precisa di attività di NF- κ B in esperimenti di co-trasfezione con copie esogene di *Nemo*.

A conferma dei risultati per le mutazioni A282G e C409R, in Vinolo et al., 2005 e Yang et al., 2004 si riporta la ridotta attività di NF- κ B dopo stimolazione con TNF α o LPS, in presenza delle mutazioni umane A288G e C417R. Tuttavia, il livello di prodotto proteico delle forme mutate risulta paragonabile alla forma Wild-type, a dimostrazione che tali mutazioni alterano il meccanismo di azione di IKK ed NF- κ B.

La mutazione A288G (sostituzione amminoacidica Alanina→Glicina), infatti, si trova nel dominio *Coiled Coil* 2 (CC2) di NEMO, coinvolto

nell'oligomerizzazione della proteina in trimeri. Questa variazione amminoacidica altera la stabilità dell'oligomero proteico e la regolazione del complesso IKK influenzando sull'attività di NF- κ B (Vinolo et al., 2005). La mutazione C417R (sostituzione amminoacidica Cisteina→Arginina), inoltre, altera la stabilità del dominio *Zinc Finger* in cui si trova. A carico della stessa posizione amminoacidica 417 sono riportate anche altre mutazioni meno frequenti, C417F/Y (Cisteina→Fenilalanina/Tiroxina) ed in particolare, la sostituzione C→F altera l'attivazione di NF- κ B in risposta a LPS, TNF α e IL-1 β (Cordier et al., 2008). Ciò conferma il ruolo critico del dominio *Zinc Finger*, principalmente coinvolto nell'attivazione di NF- κ B in risposta a diversi stimoli, nonostante il suo ruolo esatto non sia ancora chiaro.

La delezione completa del dominio *Zinc Finger* (Δ ZnF), infatti, analizzata in tale lavoro e citata anche in Cordier et al., 2008, determina una maggiore inibizione del fattore NF- κ B rispetto alle mutazioni C417R/F suggerendo che tali mutazioni, sebbene destabilizzino la struttura proteica del dominio, possono ancora consentire una certa attivazione del *pathway* NF- κ B.

Nell'ambito di questo progetto, dunque, il costrutto recante la forma Nemo_C409R è stato selezionato per la preparazione del topo transgenico in quanto, la rispettiva mutazione in uomo, C417R, riportata in 6 pazienti affetti da EDA-ID, è la più frequente a carico del dominio *Zinc Finger*.

L'analisi genotipica dei topi (bianchi, *FVB*) ottenuti in seguito all'esperimento di iniezione pronucleare ha rivelato la presenza di 10 topi positivi alla presenza del transgene. In particolare l'esemplare B0132 (Figure 25 e 26), ha mostrato una peculiare alterazione a carico

del mantello che risulta più rado se comparato al campione Wild-type, ipotizzando la presenza di un numero minore di follicoli piliferi. Questa preliminare analisi fenotipica del campione B0132 è basata su una macroscopica osservazione diretta dell'animale ma, successivamente, sarà necessario uno studio microscopico al fine di valutare alterazioni nei vari sottotipi di pelo, *Guard*, *Awl* e *Zigzag* notoriamente alterati nei modelli murini Tabby, un'analisi istologica approfondita per confermare la reale espressione di *Nemo* solo a livello dell'epidermide ed uno studio sulle ghiandole sudoripare. Tuttavia, questa prima analisi suggerisce una possibile influenza dell'over-espressione di *Nemo* mutato a livello dell'epidermide non accompagnata da particolari immunodeficienze che determinano sensibilità ad infezioni. Per indagare in modo più approfondito tale risultato, il topo B0132 ed altri topi fondatori positivi, saranno incrociati con topi neri *C57BL6*, per l'ottenimento di almeno due linee indipendenti di topi agouti (F1). La generazione F1 sarà, dunque, analizzata genotipicamente (presso il Genotyping Center presso il National Institute on Aging/NIH, MD, USA) al fine di confermare la trasmissione del transgene K17/Flag_ *Nemo*C409R. I topi F1, positivi alla presenza del transgene, saranno sottoposti ad analisi fenotipica, sezioni istologiche, immunoistochimica e studio dei maggiori geni *target* del *pathway* EDA tramite esperimenti di *microarrays*.

Inoltre, i costrutti contenenti le altre forme di *Nemo* mutato (A282G e Δ ZnF) potranno essere, successivamente, sottoposti agli stessi approcci sperimentali per la preparazione di ulteriori modelli murini transgenici da comparare al modello *Nemo_C409R* ed al classico modello EDA, Tabby.

Bibliografia

- Arnold ML, Rauskolb R, Anton-Lamprecht I, Schinzel A, Schmid W.
Prenatal diagnosis of anhidrotic ectodermal dysplasia.
Prenat. Diagn. 1984; 4:85-98.
- Bal E, Baala L, Cluzeau C, El Kerch F, Ouldin K, Hadj-Rabia S, Bodemer C, Munnich A, Courtois G, Sefiani A, Smahi A.
Autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasias at the EDARADD locus.
Hum. Mutat. 2007; 28:703-709.
- Bianchi N, Depianto D, McGowan K, Gu C, Coulombe PA
Exploiting the keratin 17 gene promoter to visualize live cells in epithelial appendages of mice.
Mol. Cell. Biol. 2005; 25:7249-7259.
- Carrol ED, Gennery AR, Flood TJ, Spickett GP, Abinun M.
Anhidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency: the role of NEMO.
Arch. Dis. Child. 2003; 88:340-341.
- Chang TT, Behshad R, Brodell RT, Gilliam AC.
A male infant with anhidrotic ectodermal dysplasia/immunodeficiency accompanied by incontinentia pigmenti and a mutation in the NEMO pathway.
J. Am. Acad. Dermatol. 2008; 58:316-320.
- Chassaing N, Bourthoumieu S, Cossee M, Calvas P, Vincent MC.
Mutations in EDAR account for one-quarter of non-ED1-related hypohidrotic ectodermal dysplasia.
Hum. Mutat. 2006; 27:255-259.
- Chen Y, Alman BA.
Wnt pathway, an essential role in bone regeneration.
J. Cell. Biochem. 2009. Epub ahead of print.
- Cordier F, Vinolo E, Véron M, Delepierre M, Agou F.
Solution structure of NEMO zinc finger and impact of an anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency-related point mutation.
J. Mol. Biol. 2008; 377:1419-1432.
- Courtois G.
The NF-kappaB signaling pathway in human genetic diseases.
Cell Mol. Life Sci. 2005; 62:1682-1691.
- Courtois G, Israël A.
NF-kappa B defects in humans: the NEMO/incontinentia pigmenti connection.
Sci. STKE. 2000; 2000:PE1.
- Courtois G, Smahi A.
NF-kappaB-related genetic diseases.
Cell Death Differ. 2006; 13:843-851.
- Courtois G, Smahi A, Reichenbach J, Döffinger R, Cancrini C, Bonnet M, Puel A, Chable-Bessia C, Yamaoka S, Feinberg J, Dupuis-Girod S, Bodemer C, Livadiotti S, Novelli F, Rossi P, Fischer A, Israël A, Munnich A, Le Deist F, Casanova JL.

A hypermorphic IkappaBalpha mutation is associated with autosomal dominant anhidrotic ectodermal dysplasia and T cell immunodeficiency.

J. Clin. Invest. 2003; 112:1108-1115.

Cruise BA, Xu P, Hall AK.

Wounds increase activin in skin and a vasoactive neuropeptide in sensory ganglia.

Dev. Biol. 2004; 271:1-10.

Cui CY, Durmowicz M, Ottolenghi C, Hashimoto T, Griggs B, Srivastava AK, Schlessinger D.

Inducible mEDA-A1 transgene mediates sebaceous glands hyperplasia and differential formation of two types of mouse hairfollicles.

Hum. Mol. Genet. 2003; 12:2931-2940.

Cui CY, Durmowicz M, Tanaka TS, Hartung AJ, Tezuka T, Hashimoto K, Ko MS, Srivastava AK, Schlessinger D.

EDA targets revealed by skin gene expression profiles of wild-type, Tabby and Tabby EDA-A1 transgenic mice.

Hum. Mol. Genet. 2002; 11:1763-1773.

Cui CY, Hashimoto T, Grivennikov SI, Piao Y, Nedospasov SA, Schlessinger D.
Ectodysplasin regulates the lymphotoxin-beta pathway for hair differentiation.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006; 103:9142-9147.

Cui CY, Schlessinger D.

EDA Signaling and Skin Appendage Development.

Cell Cycle. 2006; 5:21,e1-e7.

Cui CY, Smith JA, Schlessinger D, Chan CC.

X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia disruption yields a mouse model for ocular surface disease and resultant blindness.

Am. J. Pathol. 2005; 167:89-95.

Cui CY, Kunisada M, Esibizione D, Douglass EG, Schlessinger D.

Analysis of the Temporal Requirement for Eda in Hair and Sweat Gland Development.

J. Invest. Dermatol. 2008. Epub ahead of print.

Cui CY, Kunisada M, Esibizione D, Grivennikov SI, Piao Y, Nedospasov SA, Schlessinger D.

Lymphotoxin-beta regulates periderm differentiation during embryonic skin development.

Hum. Mol. Genet. 2007; 16:2583-2590.

Döffinger R, Smahi A, Bessia C, Geissmann F, Feinberg J, Durandy A, Bodemer C, Kenwrick S, Dupuis-Girod S, Blanche S, Wood P, Rabia SH, Headon DJ, Overbeek PA, Le Deist F, Holland SM, Belani K, Kumararatne DS, Fischer A, Shapiro R, Conley ME, Reimund E, Kalhoff H, Abinun M, Munnich A, Israël A, Courtois G, Casanova JL.

X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling.

Nat. Genet. 2001; 27:277-285.

Drogemuller C, Distl O, Leeb T.

X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia (ED1) in men, mice, and cattle.

Genet. Sel. Evol. 2003; 35:S137-145.

Durmowicz MC, Cui CY, Schlessinger D.

The EDA gene is a target of, but does not regulate Wnt signaling.

Gene 2002; 285:203-211.

Dupuis-Girod S, Corradini N, Hadj-Rabia S, Fournet JC, Faivre L, Le Deist F, Durand P, Döffinger R, Smahi A, Israel A, Courtois G, Brousse N, Blanche S, Munnich A, Fischer A, Casanova JL, Bodemer C.

Osteopetrosis, lymphedema, anhidrotic ectodermal dysplasia, and immunodeficiency in a boy and incontinentia pigmenti in his mother.

Pediatrics. 2002; 109:e97.

Elomaa O, Pulkkinen K, Hannelius U, Mikkola M, Saarialho-Kere U, Kere J.

Ectodysplasin is released by proteolytic shedding and binds to the EDAR protein.

Hum. Mol. Genet. 2001; 10:953-962.

Esibizione D, Cui CY, Schlessinger D.

Candidate EDA targets revealed by expression profiling of primary keratinocytes from Tabby mutant mice.

Gene, 2008; 427:42-6.

Estrach S, Ambler CA, Lo Celso C, Hozumi K, Watt FM.

Jagged 1 is a beta-catenin target gene required for ectopic hair follicle formation in adult epidermis.

Development, 2006; 133:4427-4438.

Fessing MY, Sharova TY, Sharov AA, Atoyan R, Botchkarev VA.

Involvement of the Edar signaling in the control of hair follicle involution (catagen).

Am. J. Pathol. 2006; 169:2075-2084.

Freire-Maia N, Lisboa-Costa T, Pagnan NA.

Ectodermal dysplasias: how many?

Am. J. Med. Genet. 2001; 104:84.

Fusco F, Pescatore A, Bal E, Ghouil A, Paciolla M, Lioi MB, D'Urso M, Rabia SH, Bodemer C, Bonnefont JP, Munnich A, Miano MG, Smahi A, Ursini MV.

Alterations of the IKBKG locus and diseases: an update and a report of 13 novel mutations.

Hum. Mutat. 2008; 29:595-604.

Gaide O., Schneider P.

Permanent correction of an inherited ectodermal dysplasia with recombinant EDA.

Nat. Med. 2003; 9:614-618.

Ghosh S, Karin M.

Missing pieces in the NF-kappaB puzzle.

Cell. 2002; S81-96.

Harris MP, Linkhart BL, Fallon JF.

Bmp7 mediates early signaling events during induction of chick epidermal organs.

Dev. Dyn. 2004; 231:22-32.

Hashimoto T, Cui CY, Schlessinger D.

Repertoire of mouse ectodysplasin-A (EDA-A) isoforms.

Gene 2006; 371:42-51.

Hashimoto T, Schlessinger D, Cui CY.

Troy binding to lymphotoxin-alpha activates NF kappa B mediated transcription.

Cell Cycle. 2008; 7:106-111.

Hayden MS, Ghosh S.

Signaling to NF-kappaB.

Genes Dev. 2004; 18:2195-224.

Headon DJ, Emmal SA, Ferguson BM, Tucker AS, Justice MJ, Sharpe PT, Zonana J, Overbeek PA.

Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development.

Nature 2001; 414:913-916.

Headon DJ, Overbeek PA

Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction.

Nat. Genet. 1999; 22:370-374.

Itin PH, Fistarol SK.

Ectodermal dysplasias.

Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet. 2004; 131C:45-51.

Jain A, Ma CA, Liu S, Brown M, Cohen J, Strober W.

Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohydrotic ectodermal dysplasia.

Nat. Immunol. 2001; 2:223-228

Jentarra G, Snyder SL, Narayanan V.

Genetic aspects of neurocutaneous disorders.

Semin. Pediatr. Neurol. 2006; 13:43-47.

Kere J, Srivastava AK, Montonen O, Zonana J, Thomas N, Ferguson B, Munoz F, Morgan D, Clarke A, Baybayan P, Chen EY, Ezer S, Saarialho-Kere U, de la Chapelle A, Schlessinger D.

X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein.

Nat. Genet. 1996; 13:409-416.

Kim HJ, Choi CP, Uhm YK, Kim YI, Lee JW, Yoon SH, Chung JH, Lee MH.

The association between endothelin-1 gene polymorphisms and susceptibility to vitiligo in a Korean population.

Exp. Dermatol. 2007; 16:561-566.

Koppinen P, Pispa J, Laurikkala J, Thesleff I, Mikkola ML.

Signaling and subcellular localization of the TNF receptor Edar.

Exp. Cell. Res. 2001; 269:180-192.

Kosaki K, Shimasaki N, Fukushima H, Hara M, Ogata T, Matsuo N.

Female patient showing hypohidrotic ectodermal dysplasia and immunodeficiency (HED-ID).

Am. J. Hum. Genet. 2001; 69:664-666.

Ku CL, Yang K, Bustamante J, Puel A, von Bernuth H, Santos OF, Lawrence T, Chang HH, Al-Mousa H, Picard C, Casanova JL.

Inherited disorders of human Toll-like receptor signaling: immunological implications.

Immunol. Rev. 2005; 203:10-20.

Kupietzky A, Houtp M.

Hypohidrotic ectodermal dysplasia: characteristics and treatment.

Quintessence Int. 1995; 26:285-291.

Lamartine J.

Towards a new classification of ectodermal dysplasias.

Clin. Exp. Dermatol. 2003; 28:351-355.

Laurikkala J, Pispä J, Jung HS, Nieminen P, Mikkola M, Wang X, Saarialho-Kere U, Galceran J, Grosschedl R, Thesleff I.

Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar.

Development 2002; 129:2541-2553.

Livak KJ, Schmittgen TD.

Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.

Methods 2001; 25:402-408

Mancini AJ, Lawley LP, Uzel G.

X-linked ectodermal dysplasia with immunodeficiency caused by NEMO mutation: early recognition and diagnosis.

Arch. Dermatol. 2008; 44:342-346.

Masunaga T, Shimizu H, Ishiko A, Fujiwara T, Hashimoto T, Nishikawa T.

Desmoyokin/AHNAK protein localizes to the non-desmosomal keratinocyte cell surface of human epidermis.

J. Invest. Dermatol. 1995; 104:941-945.

Mikkola ML, Thesleff I.

Ectodysplasin signaling in development.

Cytokine Growth Factor Rev. 2003; 14:211-224.

Millar SE.

WNTs: multiple genes, multiple functions.

J. Invest. Dermatol. 2003; 120:7-8.

Montonen O, Ezer S, Laurikkala J, Karjalainen-Lindsberg ML, Thesleff I, Kere J, Saarialho-Kere U.

Expression of the anhidrotic ectodermal dysplasia gene is reduced in skin cancer coinciding with reduced E-cadherin.

Exp. Dermatol. 1998; 7:168-174.

Morlon A, Munnich A, Smahi A.

TAB2, TRAF6 and TAK1 are involved in NF-kappaB activation induced by the TNF-receptor, Edar and its adaptor Edaradd.

Hum. Mol. Genet. 2005; 14:3751-3757.

Mou C, Jackson B, Schneider P, Overbeek PA, Headon DJ.

Generation of the primary hair follicle pattern.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006; 103:9075-9080.

Mustonen T, Pispä J, Mikkola ML, Pummila M, Kangas AT, Pakkasjarvi L, Jaatinen R, Thesleff I.

Stimulation of ectodermal organ development by Ectodysplasin-A1.
Dev. Biol. 2003; 259:123-136.

Naito A, Yoshida H, Nishioka E, Satoh M, Azuma S, Yamamoto T, Nishikawa S, Inoue J.

TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002; 99: 8766-8771.

Nakamura M, Matzuk MM, Gerstmayer B, Bosio A, Lauster R, Miyachi Y, Werner S, Paus R.

Control of pelage hair follicle development and cycling by complex interactions between follistatin and activin.
FASEB J. 2003; 17:497-499.

Nelson DL.

NEMO, NFkappaB signaling and incontinentia pigmenti.
Curr. Opin. Genet. Dev. 2006; 16:282-288.

Nenci A, Huth M, Funteh A, Schmidt-Supprian M, Bloch W, Metzger D, Chambon P, Rajewsky K, Krieg T, Haase I, Pasparakis M.

Skin lesion development in a mouse model of incontinentia pigmenti is triggered by NEMO deficiency in epidermal keratinocytes and requires TNF signaling.

Hum. Mol. Genet. 2006; 15:531-542.

Niehues T, Reichenbach J, Neubert J, Gudowius S, Puel A, Horneff G, Lainka E, Dirksen U, Schroten H, Döffinger R, Casanova JL, Wahn V.

Nuclear factor kappaB essential modulator-deficient child with immunodeficiency yet without anhidrotic ectodermal dysplasia.

J. Allergy Clin. Immunol. 2004; 114:1456-1462.

Nishikomori R, Akutagawa H, Maruyama K, Nakata-Hizume M, Ohmori K, Mizuno K, Yachie A, Yasumi T, Kusunoki T, Heike T, Nakahata T.

X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development and/or survival.

Blood 2004; 103:4565-4572.

Orange JS, Jain A, Ballas ZK, Schneider LC, Geha RS, Bonilla FA.

The presentation and natural history of immunodeficiency caused by nuclear factor kappaB essential modulator mutation.

J. Allergy Clin. Immunol. 2004; 113:725-733.

Orange JS, Levy O, Brodeur SR, Krzewski K, Roy RM, Niemela JE, Fleisher TA, Bonilla FA, Geha RS.

Human nuclear factor kappa B essential modulator mutation can result in immunodeficiency without ectodermal dysplasia.

J. Allergy Clin. Immunol. 2004; 114:650-656.

Ørstavik KH, Kristiansen M, Knudsen GP, Storhaug K, Vege A, Eiklid K, Abrahamsen TG, Smahi A, Steen-Johnsen J.

Novel splicing mutation in the NEMO (IKK-gamma) gene with severe immunodeficiency and heterogeneity of X-chromosome inactivation.

Am. J. Med. Genet. A. 2006; 140:31-39.

Pengue G, Srivastava AK, Kere J, Schlessinger D, Durmowicz MC

Functional characterization of the promoter of the X-linked ectodermal dysplasia gene

J. Biol. Chem. 1999; 274:26477-26484.

Pinheiro M, Freire-Maia N.

Ectodermal dysplasias: a clinical classification and a causal review.

Am. J. Med. Genet. 1994; 53:153-162

Pispa J, Thesleff I.

Mechanisms of ectodermal organogenesis.

Dev. Biol. 2003; 262:195-205.

Piskin G, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Teunissen MB.

In vitro and in situ expression of IL-23 by keratinocytes in healthy skin and psoriasis lesions: enhanced expression in psoriatic skin.

J. Immunol. 2006; 176:1908-1915.

Priolo M, Lagana C.

Ectodermal dysplasias: a new clinical-genetic classification.

J. Med. Genet. 2001; 38:579-85

Priolo M, Silengo M, Lerone M, Ravazzolo R.

Ectodermal dysplasias: not only 'skin' deep.

Clin. Genet. 2000; 58:415-430

Puel A, Picard C, Ku CL, Smahi A, Casanova JL.

Inherited disorders of NF-kappaB-mediated immunity in man.

Curr. Opin. Immunol. 2004; 16:34-41.

Pummila M, Fliniaux I, Jaatinen R, James MJ, Laurikkala J, Schneider P, Thesleff I, Mikkola ML.

Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression.

Development 2007; 134:117-125.

Rendl M, Lewis L, Fuchs E.

Molecular dissection of mesenchymal-epithelial interactions in the hair follicle.

PLoS Biol. 2005; 3:e331.

Saitoh T, Nakano H, Yamamoto N, Yamaoka S.

Lymphotoxin-beta receptor mediates NEMO-independent NF-kappaB activation.

FEBS Lett. 2002; 532:45-51.

Schmidt M, Gillitzer R, Toksoy A, Bröcker EB, Rapp UR, PausR, Roth J, Ludwig S, Goebeler M.

Selective expression of calcium-binding proteins S100a8 and S100a9 at distinct sites of hair follicles.

J. Invest. Dermatol. 2001; 117:748-750.

Schmidt-Ullrich R, Tobin DJ, Lenhard D, Schneider P, Paus R, Scheidereit C.

NF-kappaB transmits Eda A1/EdaR signalling to activate Shh and cyclin D1 expression, and controls post-initiation hair placode down growth.

Development 2006; 133:1045-1057.

Schneider SM, Le Gall P, Girard-Pipau F, Piche T, Pompei A, Nano JL, Hébuterne X, Rampal P.

Total artificial nutrition is associated with major changes in the fecal flora.

Eur. J. Nutr. 2000; 39:248-255.

Schmidt-Ullrich R, Tobin DJ, Lenhard D, Schneider P, Paus R, Scheidereit C.
NF-kappaB transmits Eda A1/EdaR signalling to activate Shh and cyclin D1 expression, and controls post-initiation hair placode down growth.

Development. 2006; 133:1045-57.

Shao Z, Browning JL, Lee X, Scott ML, Shulga-Morskaya S, Allaire N, Thill G, Levesque M, Sah D, McCoy JM, Murray B, Jung V, Pepinsky RB, Mi S.

TAJ/TROY, an orphan TNF receptor family member, binds Nogo-66 receptor1 and regulates axonal regeneration.

Neuron 2005; 45:353-359.

Shindo M, Chaudhary PM.

The ectodermal dysplasia receptor represses the Lef-1/beta-catenin-dependent transcription independent of NF-kappaB activation.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004; 315:73-78.

Srivastava AK, Durmowicz MC, Hartung AJ, Hudson J, Ouzts LV, Donovan DM, Cui CY, Schlessinger D.

Ectodysplasin-A1 is sufficient to rescue both hair growth and sweat glands in Tabby mice.

Hum. Mol. Genet. 2001; 10:2973-2981.

Tuhkanen AL, Agren UM, Tammi MI, Tammi RH.

CD44 expression marks the onset of keratinocyte stratification and mesenchymal maturation into fibrous dermis in fetal human skin.

J. Histochem. Cytochem. 1999; 47:1617-1624.

van der Hout AH, Oudesluijs GG, Venema A, Verheij JB, Mol BG, Rump P, Brunner HG, Vos YJ, van Essen AJ.

Mutation screening of the Ectodysplasin-A receptor gene EDAR in hypohidrotic ectodermal dysplasia.

Eur. J. Hum. Genet. 2008; 16:673-679.

Vinolo E, Sebban H, Chaffotte A, Israel A, Courtois G, Veron M, Agou F.

A point mutation in NEMO associated with anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency pathology results in destabilization of the oligomer and reduces lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-mediated NF-kappa B activation.

J. Biol. Chem. 2006; 281:6334-6348.

Yanagita M, Oka M, Watabe T, Iguchi H, Niida A, Takahashi S, Akiyama T, Miyazono K, Yanagisawa M, Sakurai T.

USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004; 316: 490-500.

Yang F, Yamashita J, Tang E, Wang HL, Guan K, Wang CY.

The zinc finger mutation C417R of I-kappa B kinase gamma impairs lipopolysaccharide- and TNF-mediated NF-kappa B activation through inhibiting phosphorylation of the I-kappa B kinase beta activation loop.

J. Immunol. 2004;172:2446-2452.

Yoshida A, Kanno H, Watabe D, Akasaka T, Sawai T.

The role of heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in the epidermal proliferation of psoriasis in cooperation with TNFalpha.

Arch. Dermatol. Res. 2008; 300:37-45.

Zonana J, Elder ME, Schneider LC, Orlow SJ, Moss C, Golabi M, Shapira SK, Farndon PA, Wara DW, Emmal SA, Ferguson BM.

A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO).

Am. J. Hum. Genet. 2000; 67:1555-1562.

Zoupa M, Seppala M, Mitsiadis T, Cobourne M.T.

Tbx1 is expressed at multiple sites of epithelial-mesenchymal interaction during early development of the facial complex.

Int. J. Dev. Biol. 2006; 50:504-510.

Zouvelou V, Luder HU, Mitsiadis TA, Graf D.

Deletion of BMP7 affects the development of bones, teeth, and other ectodermal appendages of the orofacial complex.

J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol. 2009. Epub ahead of print.

Sintesi attività di ricerca (Italiano)

La Displasia Ectodermica Anidrotica (EDA) è la più comune tra le Displasie Ectodermiche, patologie genetiche ereditarie che determinano alterazioni a carico di annessi di origine ectodermica. Nella forma EDA, infatti, si verificano difetti nello sviluppo di ghiandole sudoripare, follicoli piliferi e denti sia nei pazienti umani che nei modelli animali. Il gene *EDA*, comunemente mutato in questa patologia, codifica una proteina della famiglia TNF, Ectodisplasina, in grado di attivare il fattore NF- κ B e la trascrizione di geni *target* dipendenti da esso. Mutazioni in altri membri del *pathway* EDA-NF- κ B, come il recettore di EDA, *EDAR*, ed il suo adattatore, *EDARADD* possono determinare tale patologia. Inoltre, mutazioni nei geni *TRAF6*, *NEMO*, *IKB α* ed *NF- κ Bs* causano la forma EDA associata ad alterazioni del sistema immunitario (EDA-ID). Diverse molecole, come SHH, WNT/DKK, BMP e LT β , sono già state individuate come regolatori ed effettori del *pathway* EDA ma il pannello dei *targets* molecolari coinvolti in questa patologia è ancora incompleto.

Nella prima parte del lavoro, pertanto, è stata eseguita un'analisi del profilo di espressione di cheratinociti primari di topi Wild-type e Tabby (modello murino per la patologia EDA), al fine di identificare nuovi geni *target* del *pathway* EDA. Precedenti studi di espressione in campioni di pelle Wild-type e Tabby a vari stadi di sviluppo riportano geni espressi diversamente nei due campioni e, per un'analisi più sensibile di geni, la cui espressione potrebbe essere ristretta alle cellule dell'epidermide, questo studio è stato esteso a colture di cheratinociti primari derivati da pelle di topi Wild-type e

Tabby nello stadio E19. Analisi preliminari di "oligo" *microarrays* su genoma totale (44.000 geni) hanno individuato 385 geni "candidati preliminari" con espressione significativamente influenzata dall'alterazione del gene *Eda*. La comparazione di tali profili con quelli relativi a campioni di pelle di topi transgenici *Eda-A1* (in cui *Eda* risulta espresso ad alti livelli) ha ristretto la lista a 38 "geni candidati *target* di EDA" di cui, 14 sono già noti per essere espressi in follicoli piliferi ed epidermide. In questo lavoro è stata, dunque, confermata la variazione di espressione per 3 geni selezionati *Tbx1*, *Bmp7*, and *Jag1*, sia in cheratinociti primari che in pelle totale Wild-type e Tabby, mediante analisi di Q-PCR e Western blotting. Quindi, tale studio ha permesso di individuare nuovi geni "Candidati *target*" del *pathway* EDA.

Nella seconda parte del progetto di ricerca sono stati elaborati ed analizzati dei costrutti plasmidici per la preparazione di un modello murino transgenico per lo studio della patologia umana EDA con Immunodeficienza *X-linked* (XL-EDA-ID).

In particolare, sono stati preparati costrutti plasmidici contenenti la sequenza Wt e mutata, del cDNA del gene *Nemo* murino a valle del marcatore *Flag* e sotto il controllo del promotore epidermide-specifico K-17 (*Keratin 17*), per confinare l'espressione del transgene all'epidermide e delineare, nei topi, gli eventuali effetti della mutazione del gene consentendo un fenotipo EDA senza immunodeficienza. Tale modello potrebbe essere comparato al fenotipo del modello murino Tabby, utilizzato per lo studio della patologia EDA.

Le mutazioni riportate nei pazienti EDA-ID selezionate, sono: C417R (C409R nel modello murino), che causa destabilizzazione del dominio *Zinc Finger* nel prodotto proteico e A288G (A282G nel modello

murino), che influenza la capacità del prodotto proteico di oligomerizzare. E' stata analizzata, inoltre, come mutazione *ex-novo*, la delezione del dominio *Zinc Finger* C-terminale della proteina, Δ ZnF. I costrutti, così preparati, sono stati analizzati mediante tecniche di trasfezione transiente, esperimenti di Western blotting e saggi di luciferasi, individuando il prodotto proteico relativo alle varie forme di *Nemo* ed il livello di attivazione di NF- κ B in presenza dei mutanti, dopo stimolazione con TNF α . In particolare, l'impiego di cellule MEF_*Nemo*^{-/-} ha permesso di osservare l'attività di NF- κ B in assenza del gene *Nemo* endogeno. I risultati mostrano un'attività ridotta di NF- κ B in presenza delle varie forme di *Nemo* mutato rispetto alla forma Wild-type: 81% per A282G (A288G in uomo); 24% per C409R (C417R in uomo); 15% per Δ ZnF.

La mutazione C409R (C417R in uomo), presente in 6 pazienti affetti da EDA-ID, è stata, infine, selezionata per la preparazione del modello murino transgenico.

I topi (bianchi, FVP) ottenuti in seguito ad iniezione pronucleare della regione plasmidica *K17-promoter-Flag-Nemo_C409R*, sono stati analizzati genotipicamente ed esaminati preliminarmente a livello fenotipico. In particolare, un esemplare ha presentato visibili alterazioni a carico del mantello rispetto ai campioni Wild-type. Questa prima analisi suggerisce una possibile influenza dell'over-espressione di *Nemo* mutato a livello epidermico non associata ad immunodeficienza. Tuttavia, seguirà un ulteriore studio microscopico per l'analisi dei vari sottotipi di pelo, *Guard*, *Awl* e *Zigzag* (solitamente alterati nei modelli murini Tabby), un'analisi istologica a conferma dell'espressione di *Nemo* solo a livello dell'epidermide ed uno studio

sulle ghiandole sudoripare. Questo ed altri topi fondatori positivi saranno incrociati con topi neri C57BL6, per l'ottenimento di almeno due linee indipendenti di topi agouti da analizzare e sottoporre a studio dei maggiori geni *target* del *pathway* EDA tramite esperimenti di *microarray*.

In seguito, i costrutti contenenti le altre forme di *Nemo* mutato (A282G e Δ ZnF) potranno essere sottoposti agli stessi approcci sperimentali per la preparazione di ulteriori modelli murini transgenici da comparare al modello Nemo_C409R ed al classico modello EDA, Tabby.

Sintesi attività di ricerca (Inglese)

Anhidrotic Ectodermal Dysplasia (EDA), is the most frequent form among Ectodermal Dysplasias, hereditary genetic disorders causing ectodermal appendages defective development. Indeed, EDA is characterized by defective formation of hair follicles, sweat glands and teeth both in human patients and animals. *EDA*, the gene mutated in Anhidrotic Ectodermal Dysplasia, encodes Ectodysplasin, a TNF family member that activates NF- κ B mediated transcription. This disease can occur with mutations in other EDA-NF- κ B pathway members, as EDA receptor, EDAR and its adapter, EDARADD. Moreover, mutations in *TRAF6*, *NEMO*, *IKB α* and *NF- κ Bs* genes are responsible for Immunodeficiency associated EDA (EDA-ID). Several molecules, as SHH, WNT/DKK, BMP and LT β , have already been reported to be EDA pathway regulators or effectors although the knowledge of the full spectrum of *EDA* targets remains incomplete.

During the first part of the research project a gene expression analysis was performed in primary keratinocytes from Wild-type and Tabby (EDA model mouse) mice to identify novel EDA target genes. Earlier expression profiling at various developmental time points in Tabby and Wild-type mouse skin reported genes differentially expressed in the two samples and, to increase the resolution to find genes whose expression may be restricted to epidermal cells, the study was extended to primary keratinocyte cultures established from E19 Wild-type and Tabby skin. Using microarrays bearing 44,000 gene probes, we found 385 "preliminary candidate" genes whose expression was significantly affected by *Eda* defect. By comparing expression profiles

to those from *Eda-A1* (where *Eda-A1* is highly expressed) transgenic skin, we restricted the list to 38 “candidate *EDA* targets”, 14 of which were already known to be expressed in hair follicles or epidermis. This work confirmed expression changes for 3 selected genes, *Tbx1*, *Bmp7*, and *Jag1*, both in primary keratinocytes and in Wild-type and Tabby whole skin, by Q-PCR and Western blotting analyses. Thus, this study detected novel candidate pathways downstream of *EDA*.

In the second part of the research project, plasmid constructs were produced and analyzed to create a transgenic mouse model for Immunodeficiency associated *EDA* disease (XL-*EDA*-ID). In particular, plasmids containing mouse Wild-type and mutated *Nemo* cDNA under K-17 epidermis-specific promoter control and a Flag tag, were prepared, on the way to confine transgene expression to mice epidermis and to determine *EDA* phenotype without immunodeficiency for a comparison to Tabby model phenotype. *EDA*-ID mutations reported in patients and selected for this study are: C417R (C409R in mouse), causing Zinc Finger protein domain destabilization and A288G (A282G in mouse) affecting oligomerization of the protein. Moreover, the *ex-novo* mutation, Δ ZnF, C-terminal *Zinc Finger* domain deletion, was tested.

Thus, the constructs were analyzed by transient transfection, Western blotting and luciferase assays techniques, detecting *Nemo* Wild-type and mutant protein products and residue NF- κ B activity in presence of mutants, after TNF α stimulation. In particular, MEF_*Nemo*^{-/-} cell line was used to monitor NF- κ B activity without endogenous *Nemo* gene. Results show reduced NF- κ B activity in presence of mutated *Nemo* forms compared to Wild-type: 81% for A282G (A288G in human);

24% for C409R (C417R in human); 15% for Δ ZnF. C409R mutation (C417R in human), reported in 6 EDA-ID human patients, was selected to prepare transgenic model mouse. Mice (white, FVP) born following K17-*promoter*-Flag-*Nemo*_C409R plasmid region pronuclear injection, were analyzed for the transgene presence in the genotype and a preliminar examination of their phenotype was performed. In particular, one mouse showed considerable coat defects if compared to Wild-type mice. This preliminar analysis suggests a possible influence of *Nemo* mutant over-expression in epidermis without immunodeficiency. Still, more microscopic studies to analyze hair subtypes, *Guard*, *Awl* and *Zigzag* (usually altered in Tabby mouse model), Immunohistochemistry experiments to detect epidermis restricted *Nemo* expression and sweat glands analysis, will follow. This and other transgene positive mice will be crossed with black mice C57BL6 to obtain at least two independent agouti lines to analyze. These mice will be used in EDA target genes detection through microarrays.

Following, plasmid constructs containing other *Nemo* mutant forms (A282G and Δ ZnF) might be studied by the same experimental approaches to prepare more transgenic model mice to compare to *Nemo*_C409R and Tabby mouse models.