

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"**

**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOCHIMICA E
BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE
(XX CICLO)**

**CARATTERIZZAZIONE FISICA E FUNZIONALE
DEL *LOCUS* GENICO *IBTK***

DOCENTE GUIDA:
CH.MO PROF. GIUSEPPE SCALA

DOTTORANDA:
EMANUELA DI SALLE

COORDINATORE: CH.MO PROF. GIUSEPPE D'ALESSIO

ANNO ACCADEMICO 2006/2007

INDICE

SOMMARIO	pag. III
SUMMARY	pag. IV
INTRODUZIONE	pag. 1
<i>1.1 Trasduzione del segnale del BCR</i>	pag. 1
<i>1.2 Btk</i>	pag. 4
<i>1.3 Agammaglobulinemia di Bruton e immunodeficienza X-linked</i>	pag. 9
<i>1.4 IBtk</i>	pag. 11
MATERIALI E METODI	pag. 13
<i>2.1 Culture cellulari</i>	pag. 13
<i>2.2 Estrazione di RNA e RT-PCR</i>	pag. 13
<i>2.3 Northern Blot</i>	pag. 14
<i>2.4 5'-Rapid Amplification of cDNA Ends</i>	pag. 14
<i>2.5 3'-Rapid Amplification of cDNA Ends</i>	pag. 15
<i>2.6 Costruzione di plasmidi per la trasfezione</i>	pag. 16
<i>2.7 Trasfezione e saggio luciferasi</i>	pag. 17
<i>2.8 Analisi genomiche</i>	pag. 18
<i>2.9 Analisi evolutive</i>	pag. 19
<i>2.10 Produzione di anticorpi anti IBtk</i>	pag. 19
<i>2.11 Analisi per Western blotting</i>	pag. 21
<i>2.12 Marcatura metabolica</i>	pag. 23
RISULTATI	pag. 24
<i>3.1 Analisi del locus IBTK</i>	pag. 24
<i>3.2 Identificazione e caratterizzazione funzionale delle regioni regolatrici di IBTK</i>	pag. 30
<i>3.3 Sviluppo di anticorpi anti-IBtk</i>	pag. 34
<i>3.4 Modificazioni post-traduzionali di IBtkα e/o IBtkβ</i>	pag. 38
<i>3.5 Localizzazione cellulare di IBtkα, IBtkβ e delle loro forme proteolitiche</i>	pag. 42
DISCUSSIONE	pag. 44
BIBLIOGRAFIA	pag. 48
RINGRAZIAMENTI	pag. 50

Sommario

IBtk è l'inibitore della proteina Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) ed è stato individuato nel 2001 nel nostro laboratorio (1). Btk è una tirosina chinasi coinvolta nella trasduzione del segnale mediata dal legame dell'antigene al recettore immunoglobulinico delle cellule B (BCR). Btk è una proteina necessaria per lo sviluppo delle cellule B umane e murine e svolge un ruolo nella regolazione del ciclo cellulare e nella tumorigenesi dei linfociti B. IBtk lega Btk e ne inibisce l'attività chinasi; IBtk mappa nel *locus* genico 6q14.1, una regione di aberrazioni ricorrenti nei disordini linfoproliferativi. In questo lavoro di tesi abbiamo analizzato in dettaglio il *locus* genico umano *IBTK* individuando una complessa organizzazione. Abbiamo identificato tre diversi trascritti regolati da due promotori distinti e tre isoforme proteiche principali. Un promotore situato al 5' del gene regola la trascrizione di due trascritti: $IBTK\alpha$ e $IBTK\beta$, il primo di 29 esoni derivante dal completo *splicing* degli introni e il secondo di 24 esoni in cui l'introne 24 non subisce *splicing* ma viene riconosciuto come sequenza codificante fino ad incontrare un sito di stop di traduzione e terminazione della trascrizione. Un promotore più a valle regola la trascrizione di $IBTK\gamma$ composto da 5 esoni (esoni 25-29 più una parte dell'introne 24 di $IBTK\alpha$). Tutti e tre i trascritti vengono tradotti in proteine; è conosciuta la funzione solo di $IBtk\gamma$, l'inibitore di Btk individuato nel 2001. Da analisi bioinformatiche *IBTK* risulta un gene evolutivamente conservato. Mediante lo sviluppo di specifici anticorpi abbiamo confermato la presenza delle proteine corrispondenti ai tre trascritti *IBTK* e analizzato la loro espressione in organi murini. Dati preliminari fanno ipotizzare inoltre l'esistenza di specifiche forme proteolitiche di $IBtk\alpha$ e di $IBtk\beta$.

Summary

Bruton's tyrosine kinase (Btk) is required for human and mouse B cell development. Btk deficiency causes X-linked agammaglobulinemia (XLA) in humans and X-linked immunodeficiency in mice (XID). Unlike Src proteins, Btk lacks a negative regulatory domain at the COOH terminus and may rely on cytoplasmic Btk-binding proteins to regulate its kinase activity by *trans*-inhibitor mechanisms. Consistent with this possibility, an inhibitor of Btk, IBtk was identified in our laboratory in 2001 (1). IBtk binds to the PH domain of Btk and downregulates Btk kinase activity, Btk-mediated calcium mobilization and nuclear factor- κ B-driven transcription. IBtk is an evolutionary conserved protein coded for by a single genomic sequence at a 6q14.1 cytogenetic location, a region of recurrent chromosomal aberrations in lymphoproliferative disorders; however, the physical and functional organization of *IBTK* is unknown. We analyzed in detail the human *IBTK* locus and found a complex organization that includes three distinct mRNAs arising from complete intron splicing, an additional polyadenylation site and a second transcription start site that utilizes a specific ATG for protein translation. By 5'RACE and 3'RACE we identified three mRNA defined as IBTK α , IBTK β and IBTK γ , whose transcription is driven by two distinct promoter regions; the corresponding IBtk proteins were detected in cell lysates by specific antibodies. We found a different expression pattern of IBtk isoforms in mouse tissues. We also supposed that IBtk α and IBtk β might be proteolysed. These results may assist in the functional characterization of the Btk-IBtk protein interplay.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

Le basi molecolari della tumorigenesi in cellule B sono poco conosciute e la maggior parte delle neoplasie di tali cellule risulta ad oggi incurabile. Attraverso una conoscenza più approfondita dei meccanismi di base dello sviluppo delle cellule B, si potrebbero comprendere meglio i meccanismi molecolari dell'insorgenza di questi tumori al fine di migliorare la loro diagnosi e il loro trattamento.

In questo lavoro di tesi abbiamo analizzato il gene umano *IBTK*. IBtk è l'inibitore della proteina Btk (Bruton's tyrosine kinase) ed è stato individuato nel nostro laboratorio mediante la tecnica del doppio ibrido in lievito (1). Btk è una chinasi coinvolta nella trasduzione del segnale mediata dal legame dell'antigene al recettore immunoglobulinico delle cellule B (Ig-BCR) (2), è una proteina necessaria per lo sviluppo delle cellule B (3,4) e gioca un ruolo importante nella regolazione del ciclo cellulare e nella tumorigenesi delle cellule B (5,6,7).

1.1 TRASDUZIONE DEL SEGNALE DEL BCR

L'attivazione dei linfociti B maturi inizia in seguito al legame dell'antigene (Ag) al loro specifico recettore (BCR) composto dall'associazione immunoglobulina di membrana (mIg)–dimero $Ig\alpha$ - $Ig\beta$ (**Fig. 1**). Tale associazione porta a due effetti: l'internalizzazione dell'antigene seguita dalla sua esposizione sulle molecole MHCII e l'inizio di una complessa cascata di segnali biochimici che portano in ultimo all'attivazione dei linfociti B, al loro sviluppo nei centri germinativi (GC) per la produzione di anticorpi ad alta

affinità (8). La cascata inizia con l'attivazione, dovuta al *cross-linking* delle Ig, delle tirosine chinasi della famiglia src, in particolar modo di Lyn, che fosforilano i motivi ITAM (*immunoreceptor-based tyrosine activation motif*) delle regioni citoplasmatiche delle subunità del BCR Ig α -Ig β . Segue il reclutamento, la fosforilazione e l'attivazione delle tirosine chinasi Syk e Btk. Syk si lega mediante il dominio SH2 alle tirosine fosforilate della sequenza ITAM, viene fosforilata dalle proteine src, a sua volta fosforila la proteina adattatrice SLP-65 (conosciuta anche come *B cell linker protein* BLNK o BASH) e porta all'attivazione della chinasi PI3K α (*phosphoinositide 3-kinase*). PI3K fosforila fosfoinositidi di membrana (9). Btk, attivata dalle chinasi src, e la fosfolipasi C γ (PLC γ) si legano, mediante il dominio PH (*pleckstrin homology*), al prodotto di PI3K PtdIns (3,4,5) P $_3$ (fosfatidil inositolo trifosfato) e, mediante il dominio SH2, a SLP-65 (*SH2 domain-containing linker protein 65kDa*). Ciò porta alla fosforilazione e quindi all'attivazione da parte di Btk di PLC γ .

PLC γ degrada il fosfatidil-inositolo difosfato di membrana in inositolo trifosfato (IP $_3$) e diacilglicerolo (DAG). IP $_3$ provoca la mobilitazione di ioni Ca $^{++}$ dalle riserve endosomiali intracellulari, portando ad una rapida elevazione delle concentrazioni citoplasmatiche di questo ione che permette l'apertura dei canali del calcio CRAC (*calcium-release-activated channels*) presenti sulla membrana plasmatica. Il DAG, in presenza di Ca $^{++}$, attiva la proteina PKC (10).

Si ha quindi l'attivazione di diversi fattori di trascrizione tra cui c-Fos, JunB, NF κ B e c-Myc. Per quanto concerne NF κ B, sia la PKC che il flusso di Ca $^{++}$ provocano l'attivazione di una serina-treonina chinasi AKT/proteina chinasi B

(PKB) che fosforila e attiva IKK una serina chinasi che fosforila e causa la degradazione di I κ B α , l'inibitore di NF κ B. NF κ B controlla la trascrizione di molti geni correlati con la crescita tra cui la proteina antiapoptotica Bcl-X_L (11, 12, 13).

L'attivazione di PLC- γ è finemente regolata: da un lato infatti la fosfatasi SHIP-1 può attenuarla mediante l'idrolisi di PtdIns (3,4,5) P₃ e dall'altro Btk stimola un feedback positivo interagendo, mediante il suo dominio PH, con la fosfatidilinositolo-4-fosfato 5 chinasi (PIP5K). PIP5K produce PI (4,5) P₂ substrato sia di PI3K, che è richiesto per l'attivazione di Btk, sia di PLC- γ (9, 14, 15, 16).

Le prime risposte funzionali all'aggregazione del BCR mediata dall'antigene sono:

- entrata delle cellule precedentemente quiescenti nello stadio G₁ del ciclo cellulare; tale evento si accompagna all'aumento del volume cellulare e dell'RNA citoplasmatico e all'aumento del numero di ribosomi;
- aumentata espressione di molecole MHCII e di molecole costimolatrici, prima B7-2 e poi B7-1; grazie a questo fenomeno i linfociti B stimolati dall'antigene acquisiscono la capacità di attivare le cellule T helper;
- aumentata espressione di recettori per molte citochine di derivazione T, con conseguente aumento della capacità dei linfociti B specifici di rispondere alla cooperazione fornita dai linfociti T (8).

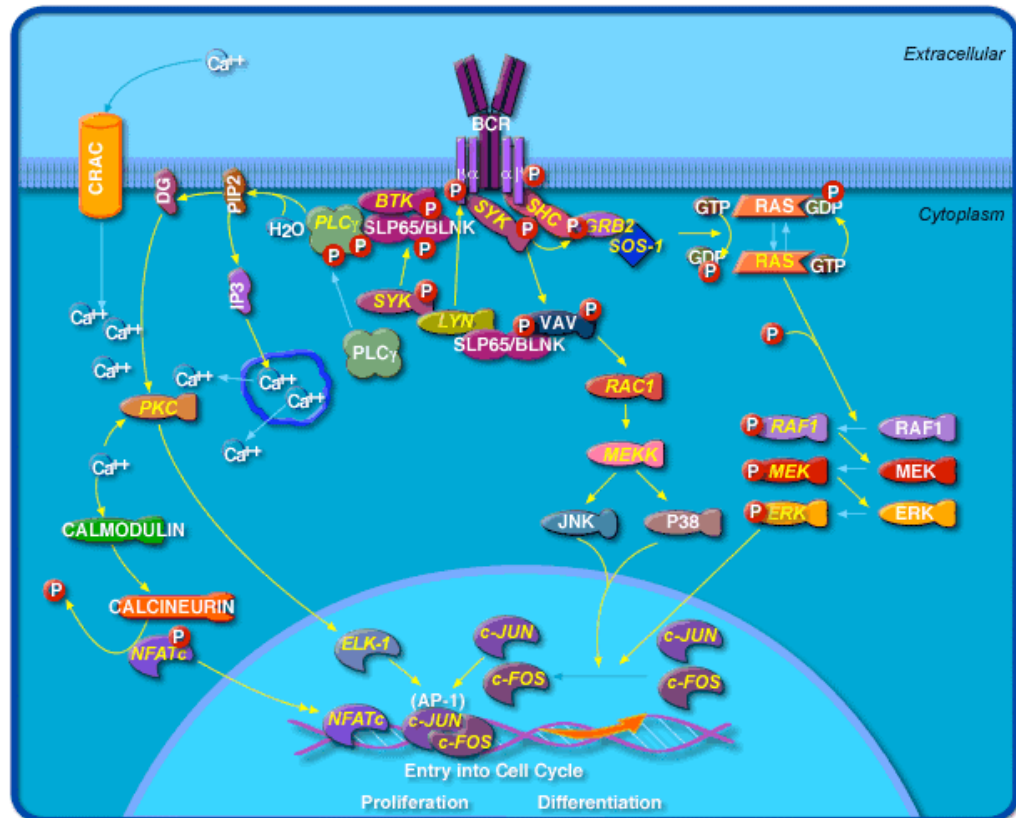


Fig. 1 Trasduzione del segnale del BCR. L'attivazione del BCR porta al reclutamento della proteina Syk che attiva Btk, quest'ultima lega la proteina SLP65 e attiva PLC γ con conseguente aumento del Ca⁺⁺ intracellulare. Si verifica anche l'attivazione della via delle MAP chinasi. Come risultato finale si ha la proliferazione e/o il differenziamento del linfocita.

1.2 BTK

Bruton's tyrosine kinase (Btk) è un membro della famiglia delle chinasi Tec, la seconda famiglia più grande di tirosine chinasi non recettoriali (17) (**Fig. 2**). Tale famiglia comprende Tec, Btk, Itk/Emt, Bmx, TXK/Rlk e Dsrc28C. Nei mammiferi le Tec chinasi sono espresse principalmente nelle cellule ematopoietiche. Le cellule B esprimono principalmente Btk mentre le cellule T esprimono sia Itk sia Rlk. Btk, oltre ad essere espressa dalle cellule B, è espressa anche nelle cellule mieloidi e nei mastociti. Le chinasi Tec sono strutturalmente simili alle chinasi della famiglia Src: possiedono infatti un dominio *Src homology* SH3 e SH2, regioni che fungono da siti di interazione

proteina-proteina, seguiti dal dominio catalitico tirosina-chinasi (SH1). Diversamente dalle Src chinasi, le Tec chinasi mancano di un dominio amminotermine miristilato e della regione regolatoria negativa carbossiterminale ma possiedono, a monte del dominio SH3, una regione *Tec homology* (TH) composta a sua volta da una regione *Btk homology*, ossia una regione di attivazione di proteine GTPasiche (GAP), e da una regione ricca in prolina (Pr) che è implicata nell'interazione con i domini SH3 e nella regolazione dell'attività chinasi. Btk, Tec e Itk possiedono anche un dominio amminotermine *pleckstrin homology* (PH) che lega i prodotti della PI3K aiutando il reclutamento delle chinasi Tec alla membrana cellulare. Esistono nei mammiferi diverse isoforme della PI3K: PI3K α , coinvolta nella cascata del segnale del BCR, PI3K γ , un effettore del segnale del GPCR. La regolazione di Btk da parte di più isoforme di PI3K renderebbe possibile un'integrazione tra i segnali del BCR e del GPCR (18).

Btk è espressa in maniera continua a partire dallo stadio pro-B tardivo (19, 20, 21) fino allo stadio di plasmacellule (3); la sua espressione è maggiore nelle cellule pre-B che in quelle mature e nelle cellule pre-B è costitutivamente attivata. Topi *btk*^{-/-} mostrano infatti un'alterata progressione da cellule pre-B *large cycling* CD43⁺ a cellule pre-B *small resting* CD43⁻ (23, 24).

Btk è predominantemente citoplasmatica e trasloca alla membrana plasmatica in seguito a diversi segnali tra cui l'attivazione del BCR, è stata però riscontrata, se pur in piccole quantità, la sua presenza nel nucleo (25, 26).

Btk è coinvolta in diversi *pathway* cellulari, infatti la perdita della sua funzione causa alterazioni, oltre che del segnale mediato dal BCR, anche di quelli di IL-5R, CD38, IL-10R e FcεRI (27).

Per essere attivata è fosforilata dalle chinasi Src nella tirosina Y551 sita nel dominio catalitico, tale fosforilazione provoca un aumento dell'attività catalitica e un'autofosforilazione della tirosina Y223 nel dominio SH3. L'autofosforilazione di Y223 potrebbe rompere il legame del dominio SH3 alla regione ricca in prolina del dominio TH, un'interazione che inattiva Btk, e potrebbe modulare il legame ai siti SH3 di proteine quali WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*), c-cbl, Sam-68 (*Src-associated in mitosis 68kDa*), vav e EWS (*Ewing's sarcoma protein*).

Mediante il suo dominio PH, Btk può interagire oltre che con PIP₃ anche con PI3P e con diverse isoforme di PKC (α, βI, βII, γ e ε). Tali interazioni, da un lato, potrebbero promuovere la localizzazione di Btk sulla membrana e attivare Btk insieme alle chinasi src e, dall'altro, potrebbero regolare negativamente l'attività chinastica di Btk; ci potrebbe, infatti, essere un *feedback* negativo per cui PKC, effettore di Btk, potrebbe contribuire alla terminazione del suo segnale.

Btk può essere anche attivata dalla diretta interazione tra il suo dominio PH e le subunità α β e γ della proteina G (28, 29, 30, 31).

Diversi esperimenti hanno dimostrato il ruolo di Btk nei flussi di Ca⁺⁺ indotti dal BCR (32). Sia il dominio PH sia quello SH2 di Btk sono coinvolti nell'attivazione del flusso di Ca⁺⁺. La mobilitazione del Ca⁺⁺ Btk dipendente è bloccata dalla cascata del segnale di FcγRIIb che può essere mediata da SHIP e dalla diminuita associazione di CD19 con PI3Kα.

Tra i segnali a valle di Btk, oltre che l'attivazione dei flussi del calcio, c'è l'attivazione differenziale della via delle MAP chinasi: in diversi sistemi si è evidenziato il ruolo di Btk nell'attivazione delle proteine JNK (chinasi che attiva il fattore trascrizionale Jun) in risposta all'attivazione di FcεRI e p38 mediata dalla proteina Gαq. JNK e p38 sono coinvolti nella trasmissione di segnali pro-apoptotici in cellule B. La regolazione di p38 e di JNK potrebbe legare Btk a vie regolanti la soglia del segnale BCR. La coattivazione del BCR con CD19 e CD45 riduce la soglia per avere un segnale BCR produttivo e da origine a un'attivazione più grande di JNK e di p38 rispetto a quella che si ottiene con l'attivazione del solo BCR o solo di CD19. L'attivazione di CD19 porta infatti all'attivazione di JNK e di p38 tramite il coinvolgimento della proteina vav, uno scambiatore di guanina per rac, con cui anche Btk può interagire.

Btk è coinvolta nell'attivazione di NF-κB indotta da LPS.

Interagisce con alcuni membri della famiglia di recettori TLR (*Toll-like receptors*), recettori coinvolti nell'immunità innata, e tale interazione provoca l'attivazione di Btk che contribuisce alla fosforilazione di p65 (subunità di NF-κB) e quindi all'attivazione di NF-κB portando alla sintesi di citochine proinfiammatorie quali TNFα e IL-6 (33).

Btk gioca quindi molti ruoli nella vita delle cellule B, è importante sia per la risposta di sopravvivenza che per quella proliferativa indotte dal legame dell'antigene al BCR ed è coinvolto nella regolazione della soglia del segnale del BCR, piuttosto che essere un componente essenziale della via del segnale del BCR (4). Si è visto infatti che *l'espressione* transgenica, in topi *ltk*^{-/-}, di Btk con un livello di espressione del 25% rispetto ai topi *wild type* (wt)

resta un convenzionale sviluppo dei linfociti B ma resta inadeguata la risposta al BCR *crosslinking*; solo se si raddoppia l'espressione di Btk transgenico si assiste ad un aumento della sensibilità *crosslinking* del BCR (34). Quindi il livello di espressione di Btk è limitante per il segnale del BCR ed è richiesto un livello soglia più basso per la sopravvivenza delle cellule B che per ottenere risposta funzionale.

Btk è stata la prima tirosina chinasi identificata con duplice funzione regolativa: sia pro che anti-apoptotica in relazione al tipo cellulare e allo stadio di sviluppo. Sembrerebbe avere un ruolo nella protezione dall'apoptosi nelle cellule B in quanto lega anche il fattore trascrizionale TFII-I (BAP-135), che regola il programma di trascrizione genica richiesto per la sopravvivenza e la progressione nel ciclo cellulare delle cellule B (35, 36). Btk inoltre inibisce l'effetto pro-apoptotico mediato dal recettore di morte Fas/APO-1 infatti, tramite i suoi domini chinasi e PH, associa con Fas e previene l'interazione FAS-FADD, ciò potrebbe significare che l'apoptosi di precursori di linfociti B durante il loro sviluppo possa essere regolata reciprocamente da Fas e Btk (6). Btk funziona, invece, come soppressore tumorale in cellule pre-B in cooperazione con la proteina SLP-65 (37, 38); Btk e SLP-65, infatti, hanno un ruolo cruciale nella regolazione del programma di sviluppo delle cellule pre-B: limitano l'espansione delle cellule pre-B e promuovono la differenziazione da cellule *large cycling* a cellule *small resting pre-B*; topi con mutazioni in entrambe le proteine (39) mostrano un completo blocco dello sviluppo delle cellule B allo stadio preB CD43⁺ pre-BCR⁺ e un drammatico aumento dell'incidenza tumorale in cellule pre-B rispetto ai singoli mutanti. Svolge un ruolo pro-apoptotico in cellule B neoplastiche e in precursori di cellule B

esposti a radiazioni ionizzanti (40), in mastociti privati di fattori di crescita (41), previene l'attivazione del fattore trascrizionale anti-apoptotico STAT3 e promuove l'apoptosi in cellule B neoplastiche e in precursori di cellule B esposti a stress ossidativi (7).

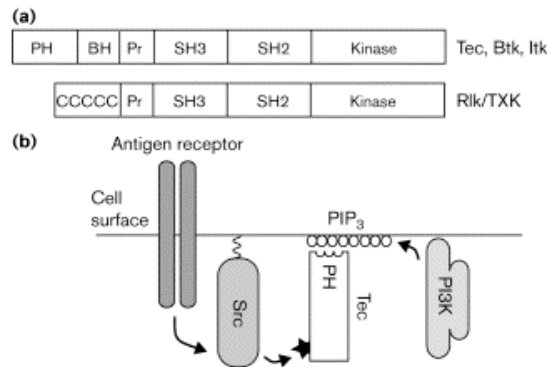


Fig 2 Tec chinasi. (A) Rappresentazione schematica dei domini delle Tec chinasi: il dominio PH è coinvolto nelle interazioni proteina-fosfolipidi e proteina-proteina, il dominio BH e la regione Pr formano il dominio TH, il dominio SH3 lega la regione Pr. Il dominio SH2 si lega a tirosine fosforilate. Il dominio chinasi è il dominio catalitico tirosina chinasi. La proteina Rlk/TXK non possiede i domini PH e BH ma un regione di ripetizioni di cisteina (CCCCC). **(B)** Il dominio PH delle chinasi Tec interagisce con i prodotti di PI3K reclutandole alla membrana cellulare. La stella indica la tirosina fosforilata nel dominio chinasi.

1.3 Agammaglobulinemia di Bruton e immunodeficienza X-linked

La mancata espressione di Btk o alterazioni funzionali in suoi domini (PH, TH, SH2, SH3 o SH1) causano nell'uomo l'agammaglobulinemia *X linked* (XLA), detta anche agammaglobulinemia di Bruton (42, 43).

Nel topo una singola sostituzione amminoacidica (R28C), derivante da una mutazione puntiforme nel dominio PH di Btk, provoca l'immunodeficienza *X-linked* (Xid) (44, 45). La sostituzione R→C non intacca l'attività chinasi di Btk ma non rende possibile il legame selettivo di Btk a PIP₃. I topi *xid* sono caratterizzati da: numero ridotto di cellule B mature (le

cellule B periferiche sono ridotte del 50% rispetto al topo *wild type*), assenza di cellule B1a peritoneali, bassi livelli di IgM e IgG3, un'alterata risposta agli antigeni di tipo II T-indipendenti. Ciò dipende da un'incapacità delle cellule di proliferare in risposta alla stimolazione del BCR, infatti, mentre i linfociti B dei topi *wild type* in seguito all'attivazione del BCR entrano nel ciclo cellulare, i linfociti B dei topi *xid* vanno incontro ad apoptosi (46).

L'agammaglobulinemia *X linked*, chiamata così perché Btk mappa sul cromosoma X, è stata la prima immunodeficienza identificata nel 1952 ed è una delle immunodeficienze congenite più comuni. È una malattia X-linked recessiva ed è quindi trasmessa da portatrici fenotipicamente normali alla progenie di sesso maschile. È caratterizzata dalla completa assenza delle gamma-globuline nel siero, da assenza o riduzione numerica dei linfociti B nel sangue periferico e nei tessuti linfoidei, assenza dei centri germinativi nei linfonodi e di plasmacellule a livello tissutale. Alcuni pazienti presentano linfociti B maturi periferici ed un livello sierico apprezzabile di IgG e IgA, tuttavia possiedono un numero di cellule B di circa 100 volte inferiore alla norma e la loro risposta anticorpale all'immunizzazione è gravemente deficitaria. La maturazione, il numero e la funzione dei linfociti T sono in genere normali anche se ci può essere una riduzione del numero dei linfociti T attivati dovuta alla deficitaria presentazione degli antigeni da parte dei linfociti B. Si ha, in effetti, il completo blocco della transizione pro-B/pre-B (le cellule si bloccano allo stadio pre-B), le cellule mostrano difetti nella regolazione del flusso del Ca^{++} . Circa il 20% dei pazienti sviluppa manifestazioni di carattere autoimmunitario. La malattia si manifesta tra i 6 mesi e i 2 anni di vita, i neonati sono spesso normali essendo protetti dagli anticorpi materni, e, se non

viene trattata, è solitamente mortale. I bambini affetti sono suscettibili alle infezioni batteriche e ad alcune malattie virali, soffrono di infezioni piogeniche ricorrenti a carico della congiuntiva, del faringe, dei tegumenti dell'orecchio medio, dei bronchi e dei polmoni. Le complicanze infettive possono essere per gran parte corrette con l'inoculazione periodica di preparazioni di γ -globuline per via intramuscolare o endovenosa come fonte di immunità passiva, questa terapia prolunga la vita dei pazienti fino alla 3^a o 4^a decade di vita; i pazienti muoiono poi, di solito, per infezioni respiratorie croniche. Il quadro clinico dei topi *xid* è più leggero di quello dei pazienti XLA e ciò non dipende dal tipo di mutazione presente, in quanto nell'uomo la mutazione singola R28C (mutazione dei topi *xid*) provoca l'agammaglobulinemia e topi *btk*^{-/-} mantengono il fenotipo *xid* (47).

1.4 IBtk

IBtk è l'inibitore di Btk lega specificamente il dominio PH di Btk e ne regola negativamente la sua attività chinasi. IBtk è stato isolato da Liu *et al.* (1) da una libreria di cDNA B-linfoblastoide umano mediante la tecnica del doppio ibrido in lievito usando come esca discreti domini di Btk. Liu ha ottenuto i seguenti risultati:

-IBtk è una proteina di 203 aa con un peso molecolare di 25,386 kDa derivante da un trascritto di 2,24 kb, è evolutivamente conservata e mappa nel *locus* citogenetico 6q14.1, una regione di ricorrenti aberrazioni cromosomiali in disordini linfoproliferativi (48, 49).

- IBtk associa specificamente con Btk come dimostrato da saggi di interazione proteina-proteina sia in vivo che in vitro. IBtk e Btk colocalizzano in discrete regioni citoplasmatiche come visto mediante microscopia confocale.

-In seguito al legame con Btk, IBtk ne regola negativamente in maniera dose dipendente l'attività chinastica di autofosforilazione della Tyr223 nel dominio SH3, autofosforilazione che eliminerebbe un'interazione inibitoria tra i domini SH3 e TH e che è richiesta per la funzione propria di Btk. Ciò è stato visto usando come substrato sia Btk endogeno sia un peptide corrispondente al dominio di Btk SH3, regione che comprende il sito di autofosforilazione Tyr223.

-La regione di IBtk implicata nella regolazione negativa dell'attività chinastica è quella C-terminale, residui 66-203.

-L'espressione di IBtk esogeno in cellule DT40 inibisce il flusso di $[Ca^{++}]$ dopo stimolazione con anti- μ .

-L'espressione di IBtk inibisce in maniera dose dipendente l'attivazione trascrizionale di NF- κ B osservata in seguito a stimolazione con anti-IgM.

- IBtk non lega e non inibisce Itk e quindi non interferisce con la mobilitazione del Ca^{++} in cellule Jurkat in seguito a stimolazione con anti-CD3.

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 Culture cellulari

Le cellule MC3, Jurkat, DeFew (50), NB4 (51), 293T (52) e HeLa (53) sono state cresciute in mezzo contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS) (Cambrex), L-glutammina 2mM, penicillina 100U/mL e streptomicina 100 U/mL (Biowhittaker). Per le cellule MC3, Jurkat, DeFew è stato usato mezzo RPMI (Cambrex) per le cellule 293T e HeLa mezzo DMEM (Cambrex). Le linee cellulari sono state incubate a 37°C in presenza del 5% CO₂.

2.2 Estrazione di RNA e RT-PCR

RNA totali, estratti mediante Trizol (Invitrogen), e mRNA PoliA, estratti mediante mRNA Oligotex Mini Kit (Qiagen), sono stati usati per sintetizzare tre cDNA doppio filamento con SuperScript One-Step RT-PCR con Taq Platinum (Invitrogen). In effetti, le reazioni di RT-PCR sono state effettuate in un unico passaggio usando tre coppie oligonucleotidi specifici per IBtk α , IBtk β , IBtk γ :

-gli oligonucleotidi ex24f (5'-GTC AGC CCT CCT GTT GTG GAT-3') e I24/25r (5'-TGG ATC AAA ATG CTC ACA AGT T-3') hanno amplificato un frammento del cDNA di IBtk β ;

-gli oligonucleotidi ex24f (5'-GTC AGC CCT CCT GTT GTG GAT-3';) e ex25r (5'-TGC ATT CAC TGG TTT GGG GGC-3') hanno amplificato un frammento del cDNA di IBtk α ;

-gli oligonucleotidi I24/25f (5'-TGG GCA ATT TAG CCT CCA TA-3') e ex25r (5'-TGC ATT CAC TGG TTT GGG GGC-3') hanno amplificato un frammento del cDNA di IBtk γ .

La lunghezza dei frammenti amplificati è stata analizzata mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5% usando come marcatore di peso molecolare 100 bp DNA ladder (Promega).

2.3 Northern Blot

1µg/pozzetto di mRNA poliA di MC3, Jurkat e HeLa è stato applicato su gel di agarosio formaldeide-1% e trasferito su filtri di nylon Hybond N⁺ (Amersham Biosciences). I filtri sono stati ibridizzati alternativamente con due frammenti di *IBTK* umano marcati con ³²P: sonda ex12 e sonda Int24 usando come controllo un sonda per GAPDH marcata con ³²P.

Per creare i frammenti successivamente marcati sono stati usati i seguenti oligonucleotidi:

-per la sonda ex12: ex12f 5'-GCA ATA GAC TCT TCC CTG CAC-3' e ex12r 5'-GGC AGA AGA GCA AAC CTA AAT-3';

-per la sonda Int24/25: I24/25f 5'-TGG GCA ATT TAG CCT CCA TA-3' e I24/25r 5'-AAC TTG TGA GCA TTT TGA TCC A-3';

- per la sonda GAPDH: GAPDHf 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGTC-3' e GAPD Hr: 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'.

2.4 5'- Rapid Amplification of cDNA Ends (5'RACE)

Per identificare i siti di inizio della trascrizione (TSS) di *IBtkα*, *IBtkβ* e *IBtkγ* sono state effettuate due reazioni di 5'RACE, usando 5'RACE System 2.0 kit (Invitrogen). Da 1µg di mRNA PoliA, estratto da cellule MC3 mediante Trizol (Invitrogen), e mRNA Oligotex Mini Kit (Qiagen), è stato sintetizzato, tramite la RNA polimerasi SuperScriptII, il primo filamento di cDNA. Gli oligonucleotidi utilizzati sono i seguenti:

-per *IBtkα* e *IBtkβ*, GSP1R (5'-GAG TGA GGA GGG GAA CT-3');

-per *IBtkγ*, GSP6R (5'-GAG TCA AGT TTC TGG GAT GTA ATA CTG-3');

Dopo l'aggiunta di una coda di oligo-dC all'inizio dei trascritti, sono state effettuate due *nested* PCR usando oligonucleotidi più interni.

La prima PCR è stata effettuata utilizzando gli oligonucleotidi specifici:

-per IBtk α e IBtk β , GSP2R (5'-GGT GAC CAG TCG CTA GAT GAA A-3');

- per IBtk γ , GSP5R (5'-GAG TCA AGT TTC TGG GAT GTA ATA CTG-3');

e l'oligonucleotide *Abridged Anchor Primer* (AAP) (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3') contenente al 3' un oligo-dI-dG.

La seconda PCR è stata effettuata con gli oligonucleotidi:

-per IBtk α e IBtk β , GSP3R (5'-GGT GGA TTC CGC AGG GTC CAC ATA-3');

-per IBtk γ , GSP4R (5'-GGA GGC TAA ATT GCC CAG AAA AGG-3').

I frammenti di DNA ottenuti sono stati eluiti dal gel di agarosio mediante Qiaquick Extration kit (Qiagen) e sequenziati mediante il sistema di sequenziamento con ABI PRISM DNA (Applied Biosystems).

2.5 3'- *Rapid Amplification of cDNA End* (3'RACE)

Per individuare la fine dei tre trascritti abbiamo effettuato due reazioni di 3' RACE. Il primo filamento di cDNA è stato sintetizzato da 1 μ g di mRNA PoliA di cellule MC3 tramite trascrittasi inversa (3'RACE system Invitrogen), utilizzando l'oligonucleotide 3'RACE avente una sequenza di adattatore al 5' della sequenza oligo (dT) (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T-3').

Sono state effettuate tre tappe di PCR. Nel primo passaggio il cDNA è stato amplificato con l'oligonucleotide adattatore e gli oligonucleotidi specifici:

-per IBtk β , GSP4L (5'-CCT TTT CTG GGC AAT TTA GCC TCC ATA-3');

-per IBtk α e IBtk γ , GSP7L (5'-GCC TGG GAG ACA CAT AAG CAA T-3').

La seconda PCR è stata effettuata usando l'oligonucleotide adattatore e altri oligonucleotidi più interni specifici:

-per IBtk β , GSP5L (5'-CAG TAT TAC ATC CCA GAA ACT TGA CTC-3');

-per IBtk α e IBtk γ , GSP8L (5'-GAA GGT AAG CCT GGG AGA CAC ATA -3').

La terza PCR è stata effettuata usando l'oligonucleotide adattatore e gli oligonucleotidi specifici:

-per IBtk β , GSP6L (5'-GTG ATA TGT TGG AGG GCT CAT A-3');

-per IBtk α e IBtk γ , GSP9L (5'-CAG AAG TTC TCT GAA CCT CAA TTG T -3').

I prodotti finali di PCR sono stati purificati su gel di agarosio (QIAEXII Gel Extraction kit - QIAGEN) e sono stati sequenziati mediante il sistema di sequenziamento ABI PRISM DNA (Applied Biosystems).

2.6 Costruzione di plasmidi per la trasfezione

Mediante PCR sono stati amplificati dal DNA genomico umano diversi frammenti dei promotori di IBtk α -IBtk β e IBtk γ e inseriti in pGL3- *vector* (Promega) dopo digestione con KpnI e BglII. Per il promotore di IBtk α -IBtk β abbiamo analizzato quattro frammenti: -755/+22, -157/+22, -82/+22 e -67/+22.

Per amplificare i frammenti abbiamo utilizzato i seguenti oligonucleotidi in senso:

- per -755/+22 5'-GGG GTA CCA GGC ATT CAG CAG CAG TGT G-3',

- per -157/+22 5'-GGG GTA CCC GGC GAG GTC AAG TTC CTT T-3',

- per -82/+22: 5'-GGG GTA CCG CAC CAG CCA ATC ATC AAG AG-3',

-per -67/+22: 5'-GGG GTA CCC AAG AGA CAT ACA GGA GCC C-3'.

Per tutti i frammenti abbiamo utilizzato lo stesso oligonucleotide antisenso: 5'-GAA GAT CTC GGG AAC GGG GAT GTA GA-3'.

Per il promotore di IBtk γ abbiamo analizzato due frammenti: -691/+5 e -155/+5.

Abbiamo utilizzato i seguenti oligonucleotidi in senso:

-per -691/+5: 5'-GGG GTA CCG GCT GTA GTG CAG TGG TAT GAT-3',

- per -155/+5: 5'-GGG GTA CCT CCT GTC AGC CCT CCT GTT G-3',

e per entrambi in oligonucleotidi antisenso:

5'-GAA GAT CTG TCT GTC CAA TTC TTA GGG CAG AA-3'.

Per la produzione dei costrutti 3xFlagIBtk α e 3xFlagIBtk β abbiamo amplificato i cDNA corrispondenti alla sequenze codificanti di IBtk α e di IBtk β mediante RT-PCR a partire da RNA totale di cellule MC3, utilizzando per entrambi l'oligonucleotide in senso 5'-CCGAAGCTTCCTGACTGCACATCAAAGTGTGATC3' e gli oligonucleotidi 5'-CGGGATCCCTAGCATCCATGCTTATTCAACATAGG-3' per IBtk α e 5'-CGGGATCCGAGTCAAGTTTCTGGGATGTAATACTG-3' per IBtk β . I frammenti ottenuti sono stati inseriti nei siti HindIII e BamHI del vettore p3XFLAG-CMV-7,1 (Sigma).

2.7 Trasfezione e saggio luciferasi

Cellule 293T (3×10^5 cellule/pozzetto) sono state cresciute in piatti da 6 pozzetti per 24h prima della trasfezione. La trasfezione è stata effettuata con il metodo del calcio fosfato (Invitrogen). Come controllo negativo del saggio luciferasi è stato usato un vettore pGL3 Basic. Ogni pozzetto è stato trasfettato con 0,5 μ g di costrutti plasmidici. Per normalizzare l'efficienza di trasfezione, in ogni esperimento abbiamo cotrasfettato le cellule con 0,2 μ g di pCMV β vector

(Clontech) che esprime la β -galattosidasi sotto il promotore del citomegalovirus. Dopo 24h dalla trasfezione le cellule sono state lavate due volte con PBS e poi raccolte. I lisati cellulari e il saggio luciferasi sono stati effettuati usando il Dual Light System (Applied Biosystem). I risultati sono stati normalizzati mediante l'attività β -galattosidasi. Abbiamo effettuato minimo tre esperimenti indipendenti e abbiamo riportato in grafico i valori medi.

Per le trasfezioni dei plasmidi 3XFlag-IBtk α e 3XFlag-IBtk β , le cellule 293T (1×10^6 cellule/piastra) sono state cresciute in piatti da 100x20 mm per 24 ore prima della trasfezione. La trasfezione è stata effettuata con il metodo del calcio fosfato (Invitrogen) e ogni piastra è stata trasfettata con 14 μ g di plasmide. I lisati cellulari sono stati effettuati 48 h dopo la trasfezione.

2.8 Analisi genomiche

Abbiamo cercato geni omologhi ad *IBTK* umano in cane, topo, mucca, gallina, *Xenopus tropicalis*, *Fugu rubripes* e *Tetraodon nigroviridis* tramite TBLASTN (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>) e BLAT (<http://genome.ucsc.edu/>), usando come esca la sequenza amminoacidica di IBtk umana. Dalle sequenze amminoacidiche siamo risaliti alle sequenze genomiche, quest'ultime sono state allineate alle sequenze cDNA/EST disponibili per avere informazioni sull'architettura genica. I geni che mancano di trascritti conosciuti sono stati analizzati manualmente, esaminando i siti donatori e accettori di *splicing*, per definire la struttura genica.

2.9 Analisi evolutive

Le sequenze amminoacidiche sono state allineate mediante MULTIALIN (54).

Le percentuali di evoluzione locale delle proteine IBtk α delle diverse specie sono state calcolate con il metodo “evoluzione-struttura-funzione” (55).

Tale analisi richiede prima una ricostruzione delle relazioni evolutive tra tutte le proteine analizzate. A tal fine abbiamo costruito l’albero filogenetico di IBtk α usando PHYLO-WIN (56) e, ponendo il livello di ramificazione costante, abbiamo calcolato su tutto l’allineamento amminoacidico il numero di sostituzione per sito in finestre di 15 aa con CODEML (57).

Infine le percentuali relative di mutazione sono state calcolate dividendo il numero di sostituzioni per sito in ogni finestra, per la media di tutte le finestre (ottenendo la percentuale relativa).

I valori finali sono stati calcolati limando le percentuali relative con una media matematica mobile di 7 posizioni.

É stato quindi effettuato un grafico ponendo il profilo evolutivo sull’asse delle y e la posizione di allineamento sull’asse delle x. Una lista dei punti minimi, che definisce le regioni evolutivamente costrette (ECR), è stata ottenuta analizzando il riquadro dal basso (minimo) all’alto (massimo).

2.10 Produzione di anticorpi anti IBtk.

Abbiamo sviluppato un anticorpo policlonale contro IBtk α e IBtk β nella gallina. Due galline sono state immunizzate (Gallus Immunotech inc.) con il peptide 31B NFHEDDNQKSC (aa 672-681 di IBtk α e IBtk β) coniugato alla KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*). Sono state effettuate un’immunizzazione primaria (0,75 mg in adiuvante di Freund completo) e tre richiami (0,25 mg in adiuvante incompleto Freund). Abbiamo purificato le IgY specifiche contro il

peptide 31B mediante cromatografia di affinità usando il peptide 31B legato a sefarosio ((NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, GE Healthcare).

Per sviluppare un anticorpo policlonale contro IBtk α e IBtk γ abbiamo immunizzato un ratto con la proteina di fusione His-IBtk γ 1-164 ossia con la regione di IBtk γ di maggiore divergenza uomo-ratto. Per produrre His-IBtk γ 1-164 abbiamo generato mediante RT-PCR il cDNA corrispondente alle prime 500 bp del trascritto maturo IBTK γ a partire da RNA di cellule MC3 usando gli oligonucleotidi:

5'CGGGATCCGGTGGTGGTGGTCCGTTAATTGATATAAATTTCTAGCAAAAATGATTTC3' e
5'CCCAAGCTTTCAGGATGGAGCAGTCACTGA3'. Il frammento ottenuto è stato inserito nel vettore pQE-100 (Qiagen) nei siti BamHI e HindIII e il costrutto di fusione è stato espresso in cellule E. coli M15 pREP4, effettuando un'induzione con IPTG 1mM di 4 ore a 28°C. I batteri sono stati lisati mediante sonicazione e la proteina è stata purificata mediante cromatografia di affinità su resina HIS-Select Nickel Affinity Gel (Sigma) e dializzata in PBS. Sono state effettuate un'immunizzazione primaria (150 μ g di proteina in adiuvante completo di Freund) e quattro richiami (100 μ g di proteina in adiuvante incompleto di Freund) in ratti. Mediante ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) abbiamo testato il titolo e la reattività dei sieri ottenuti.

Per sviluppare un altro anticorpo policlonale contro IBtk α e IBtk γ , abbiamo immunizzato topi IBTK α con la proteina ricombinante GST-IBtk γ . Per produrre la GST-IBtk γ , abbiamo generato mediante RT-PCR il cDNA corrispondente al trascritto maturo IBTK γ a partire da RNA di cellule MC3 usando i seguenti oligonucleotidi 5'-CGGAATTCGGTGGTGGTGGTCCGTTAATTGATATAAATTTCTAGCAAAAATGATTTC3' e 5'-

CCGCTCGAGGCATCTCAACTCCACAGTG-3'). Il frammento ottenuto è stato inserito nel vettore pGEX-4T-3 (GE Healthcare) nei siti EcoRI e XhoI e il costrutto di fusione è stato espresso in cellule E. Coli BL21. La proteina GST-IBtk γ risultava presente nei corpi di inclusione per cui è stata da essi purificata usando la soluzione denaturante (urea 8M, 1% Triton X-100, DTT 5mM) ed infine è stata purificata da gel. Abbiamo quindi immunizzato topi *ibtk* $-/-$ con GST-IBtk γ omogenizzata da gel. Abbiamo effettuato un'immunizzazione primaria (0,2 mg di proteina in adiuvante completo di Freund) e tre richiami (0,1mg di proteina in adiuvante di Freund incompleto). Mediante ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) abbiamo testato il titolo e la reattività dei sieri ottenuti.

Per ottenere un anticorpo specifico contro IBtk β abbiamo immunizzato topi *ibtk* $-/-$ con la proteina di fusione GST-IBtk β 1145-1196, la porzione di IBtk β codificata dall'introne. Tale porzione è stata amplificata mediante PCR (PCR Supermix High fidelity Invitrogen) a partire dal plasmide 3XFlag-IBtk β utilizzando gli oligonucleotidi 5'- CGGAATTCCTTAGGGTGGGTGAAAAACATTACAAAAG-3' e 5'- CCGCTCGAGGAGTCAAGTTTCTGGGATGTAATAC -3' ed è stata clonata nel vettore pGEX-4T-3. La proteina è stata estratta dai corpi di inclusione e purificata da gel. È stata effettuata un'immunizzazione primaria e due richiami, in corso sono altri richiami.

2.11 Analisi per Western blotting

I lisati cellulari sono stati effettuati in RIPA buffer (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NP-40 1%, NaCl 150mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM e inibitori di proteasi), soggetti a corsa elettroforetica su gel 8% o 12% usando come marcatore di

peso molecolare *Precision Plus Protein Standards* (Biorad) e trasferiti su membrana di PVDF. Gli estratti nucleari e citosolici sono stati effettuati con il kit *cellLytic NucLEAR Extraction kit* (Sigma). Gli organi di topi WT C57BL sono stati omogeneizzati in modo meccanico e le sospensioni ottenute sono state private delle impurità e dei residui fibrosi utilizzando filtri *cell strainer* (Falcon). I globuli rossi sono stati lisati con *buffer ACK* (Biowhittaker). Abbiamo rivelato IBtk α e IBtk β usando come anticorpo primario le IgY anti 31B (10 μ g/mL) e anticorpo secondario α -chicken-HRP (Gallus Immunotech Inc.). Come controllo di specificità del legame dell'anticorpo è stato effettuato uno spiazzamento: una parte di anticorpo primario è stata preincubata con il peptide 31B (rapporto molare IgY/peptide=1/1000).

Abbiamo rivelato IBtk α e IBtk γ usando come anticorpo primario il siero anti GST-IBtk γ di un topo immunizzato 4 volte (diluizione 1:500) o di un topo immunizzato 5 volte (diluizione 1:2000), e come anticorpo secondario con α -mouse-HRP (GE Healthcare). Come controllo di specificità del legame dell'anticorpo è stato effettuato uno spiazzamento: una parte dell'anticorpo primario è stato preincubato con GST (60nmoli/mL) e parte con GST-IBtk γ (60 nmoli/mL).

Per rilevare IBtk β abbiamo usato siero di topo immunizzato con GST-IBtk β 1145-1196 1:100. Per rivelare la tubulina sono stati usati gli anticorpi α - γ tubulin (Sigma) e α -mouse-HRP (GE Healthcare). Per rivelare l'istoneH1 abbiamo usato l'anticorpo HistoneH1 (Santa Cruz) e α -mouse-HRP. I segnali sono stati visualizzati tramite *enhanced chemiluminescence* (ECL, e ECL plus, GE Healthcare).

2.12 Marcatura metabolica

Le cellule DeFew (5milioni/pozzetto) sono state sottoposte ad affamamento per 1h a 37°C utilizzando mezzo DMEM privo di metionina e cisteina 0,1% di FBS e L-glutammina 2mM, sono state poi marcate con mezzo di affamamento più 100µCi/mL di [³⁵S] (ProMix, GE Healthcare) per 2h a 37°C .

Sono stati effettuati lisati sottoposti poi a immunoprecipitazione con siero di ratto preimmune e siero di ratto immunizzato con His-IBtkγ 1-164 (0,2mL), precedentemente incubati con proteina G legata a sefarosio (GE Healthcare) ON a 4°C.

CAPITOLO 3

RISULTATI

3.1 Analisi del locus *IBTK*.

Il gene umano *IBTK* mappa nel locus citogenico 6q14.1 e si estende su una regione genomica di 113,80 kb.

Abbiamo individuato tre diversi trascritti (**fig. 3**):

-un trascritto lungo, $IBTK\alpha$, di 5798 nucleotidi formato da 29 esoni con un codice di lettura per una proteina di 1353 aa e un peso molecolare di 150,545 kDa;

-un trascritto intermedio, $IBTK\beta$, formato dai primi 24 esoni di $IBTK\alpha$ e una parte dell'introne 24 di $IBTK\alpha$ che funge da mini-esone. Tale trascritto da origine ad un mRNA maturo di 4437bp e presenta un codice di lettura per una proteina composta da 1196 aa e con un peso molecolare di 133,87 kDa;

-un trascritto corto, $IBTK\gamma$, formato da una parte dell'introne 24 e dagli esoni 25-29 di $IBTK\alpha$ (**fig. 3c**). Tale trascritto è lungo 2328 bp e presenta un codice di lettura per una proteina di 240 aa (di cui 31 aa codificati dall'introne 24) e con un peso molecolare di 26,31 kDa.

Il trascritto individuato da Liu *et al* (1) corrisponde ad $IBTK\gamma$ meno 129 bp.

Esperimenti di Northern blot confermano l'esistenza dei tre diversi trascritti in diverse linee cellulari (HeLa, Jurkat e MC3): utilizzando una sonda corrispondente ad una porzione dell'esone 12 abbiamo individuato una banda di circa 6.0 kb, che corrisponde al trascritto maggioritario $IBTK\alpha$, mentre una sonda corrispondente ad una porzione dell'introne 24 di $IBTK\alpha$ ci ha permesso di individuare una banda di 4.5 kb, trascritto $IBTK\beta$, e una banda di 2.2 kb, trascritto $IBTK\gamma$ (**fig. 4A**).

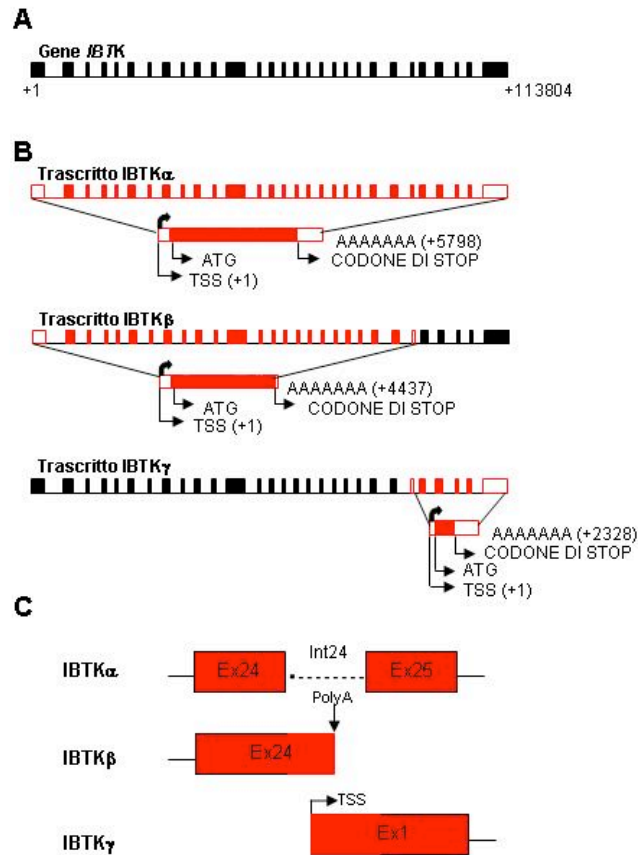


Fig 3 Isoforme alternative del mRNA IBTK umano (A) Rappresentazione schematica del gene *IBTK*. I rettangoli neri rappresentano i 29 esoni del gene e i numeri indicano le coordinate del gene. **(B)** Rappresentazione dei tre diversi mRNA (in rosso) codificanti per le tre isoforme IBTK; gli esoni che formano ciascun trascritto sono in rosso. I numeri indicati in parentesi indicano la lunghezza dei trascritti. **(C)** Rappresentazione dettagliata della struttura di mRNA in corrispondenza della regione tra gli esoni 24 e 25. TSS: *Transcription start site*.

Mediante RT-PCR su RNA di cellule MC3 abbiamo dimostrato che:

- nel trascritto IBTK α , l'introne 24 viene soggetto a *splicing*, infatti, utilizzando gli oligonucleotidi Ex24f e Ex25r che mappano rispettivamente nell'esone 24 e 25, amplifichiamo da RNA totale e RNA poliA un frammento di 231 bp;

- nel trascritto IBTK β l'introne 24 non è sottoposto a *splicing* ma costituisce sequenza esonica, infatti utilizzando gli oligonucleotidi EX24f e I24r, che mappano rispettivamente nell'esone 24 e nell'introne 24, amplifichiamo un frammento di 586 bp ;
- nel trascritto IBTK γ l'introne 24 costituisce sequenza esonica, infatti gli oligonucleotidi I24f e Ex25r amplificano un frammento di 638 bp sia su RNA totale sia su RNApoliA (**fig. 4B, 4C**).

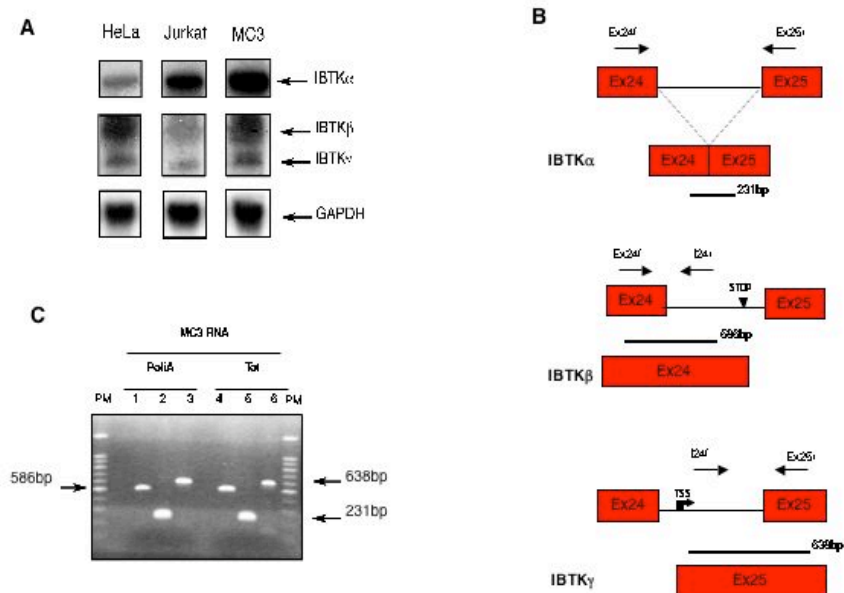


Fig 4. Analisi dei trascritti IBTK. (A) Analisi di Northern blot effettuato su mRNA poliA (1 μ g) di cellule HeLa, Jurkat e MC3 usando sonde specifiche: sonda ex12, per IBTK α ; sonda Int24, specifica per IBTK β e IBTK γ . Come controllo è stata usata una sonda per GAPDH. (B) Rappresentazione schematica dell'analisi di RT-PCR: le frecce indicano la posizione sul gene *IBTK* degli oligonucleotidi usati per l'amplificazione e le linee in grassetto le regioni amplificate attese per ogni trascritto. (C) RT-PCR effettuata su RNA totale di cellule MC3 (200 ng) e mRNA poliA (20 ng).

Abbiamo identificato i siti di inizio e di terminazione della trascrizione dei tre trascritti mediante RACE (*rapid amplification of cDNA ends*).

Mediante 5'RACE abbiamo individuato due siti di inizio della trascrizione (TSS):

-un sito di inizio comune ad IBTK α e ad IBTK β presente al 5' del gene, base (+1), seguito da un sito di inizio della traduzione ATG a +551bp (**fig. 5A**)

-un sito di inizio (+1) di IBTK γ situato a 4054 basi a valle del TSS del trascritto IBTK α (**fig. 5B**).

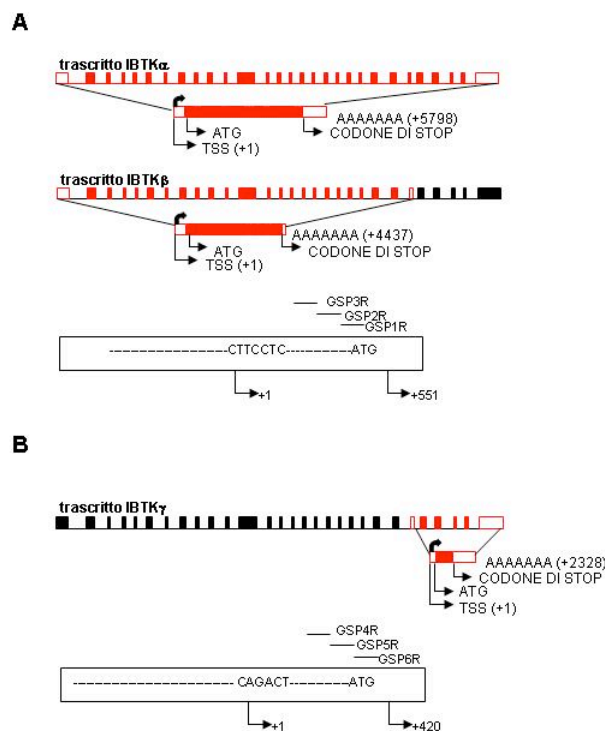


Fig. 5 Identificazione dei siti di inizio della trascrizione (TSS) di IBTK mediante 5' RACE. I TSS sono indicati da frecce nere in grassetto; tutte le ORF (*open reading frame*) sono rappresentate in rosso, le punte delle frecce indicano il senso della traduzione. Sono indicate le precise posizioni del TSS, dell'ATG iniziale e del sito di stop della traduzione. In (A) è rappresentato il TSS comune ad IBTK α e IBTK β , trascritti originati dallo stesso promotore e sono indicati gli oligonucleotidi utilizzati. In (B) è rappresentato il TSS del trascritto IBTK γ originato da un altro promotore e sono indicati gli oligonucleotidi utilizzati.

Mediante un'analisi di 3'RACE a partire da mRNA poliA, abbiamo identificato due siti di poliadenilazione:

- il sito di poliadenilazione comune ad IBTK α e ad IBTK γ , situato al 3' del gene, nucleotidi 5573-5578 rispetto al sito di inizio del trascritto IBTK α e nucleotidi 2303-2308 rispetto al sito di inizio del trascritto IBTK γ (**fig. 6A**);
- il sito di poliadenilazione del trascritto IBTK β situato in quello che è l'introne 24 nel trascritto IBTK α , basi 4408-4413 rispetto al sito di inizio della trascrizione (**fig. 6B**).

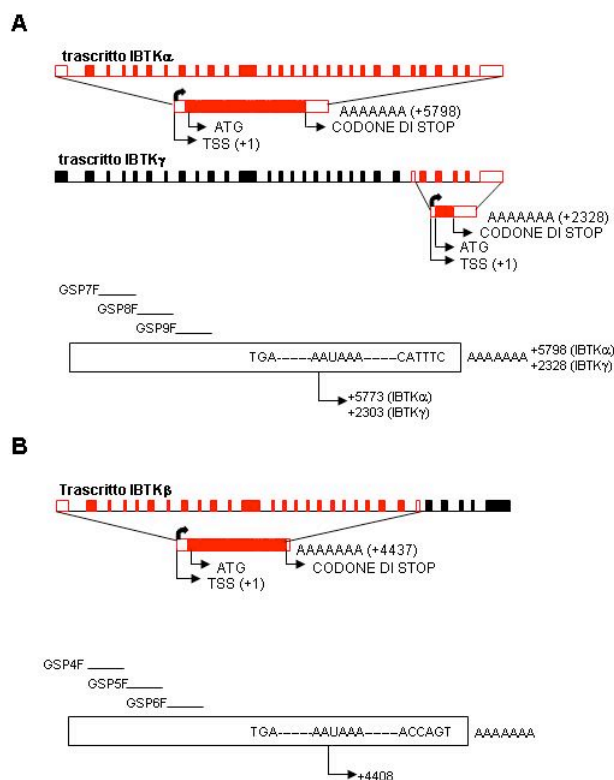


Fig. 6 Identificazione dei siti poliadenilazione dei trascritti IBTK mediante 3'RACE. Per ottenere la completa sequenza dell'estremità 3' dei trascritti IBTK abbiamo effettuato una 3' RACE utilizzando gli oligonucleotidi GSP7F, GSP8F, GSP9F per i trascritti IBTK α e IBTK γ (**A**) e gli oligonucleotidi GSP4F, GSP5F, GSP6F per il trascritto IBTK β (**B**). IBTK α e IBTK γ hanno lo stesso sito di fine della trascrizione mentre per IBTK β è differente. Sono indicati la posizione e la sequenza dei siti PolIA.

Per accertare la presenza di geni ortologhi ad *IBTK* in altri organismi abbiamo effettuato un'analisi BLAT nella banca genomica dell'Università di

Santa Cruz della California (UCSC). Ogni specie analizzata ha un solo gene omologo ad *IBTK* umano. Da un'analisi comparativa dell'introne 24 umano con le sequenze ortologhe dei mammiferi filogeneticamente vicine e lontane dall'uomo *Pan troglodytes*, *Pongo pygmaeus*, *Canis familiaris*, *Bos taurus* e *Mus Musculus*, abbiamo riscontrato in tutte la possibilità dell'esistenza dell'isoforma *IBTK γ* . *Pan troglodytes*, *Pongo pygmaeus* e *Bos taurus* presentano lo stesso ATG iniziale dell'uomo nello stesso codice di lettura dell'esone a valle, *Canis familiaris* presenta un ATG di inizio traduzione, nel codice di lettura corrispondente a quello dell'esone seguente, più a valle rispetto a quello dell'uomo, *Mus Musculus* presenta il primo ATG utile nell'esone 25.

L'isoforma *IBTK β* potrebbe essere presente in *Pan troglodytes*, *Pongo pygmaeus*, *Canis familiaris*, *Bos taurus* in quanto il sito di poliadenilazione di *IBTK β* umano è conservato in queste specie, ma non in *Mus Musculus* che non presenta alcun sito di poliadenilazione (**fig. 7**).

Abbiamo inoltre effettuato un'analisi filogenetica della proteina *IBtk α* , tale analisi mostra come questa sia evolutivamente conservata (**fig. 8A**).

Generalmente i domini funzionalmente rilevanti sono soggetti a vincoli evolutivi che rendono il loro tasso evolutivo più basso di quello di altri domini, perciò valutare le regioni evolutivamente vincolate (ECR) può aiutare ad individuare i domini funzionali di una proteina (55). Abbiamo effettuato un'analisi ECR sulle sequenze di *IBtk α* di uomo, topo, gallina, Xenopus, Fugu e Tetraodon identificando nove regioni con forte conservazione tra le diverse specie (**fig. 8B, 8C**). Da un'analisi sulle banche dati PROSITE (58) e SMART (59) cinque di queste corrispondono a domini proteici conosciuti (**fig. 8C, 8D**):

- un dominio di ripetizioni di anchirine, regione solitamente coinvolta nelle interazioni proteina-proteina (60);
- due domini RCC1 (regione regolatrici della condensazione cromosomica), trovati in proteine con un ruolo nella modulazione dell'espressione genica (61);
- due domini BTB/POZ trovati in regolatori trascrizionali che controllano la struttura della cromatina (62, 63).

Non corrispondono invece a domini conosciuti le altre ECR compresa ECRi, l'ECR più conservata di tutte comune ad IBtk α e ad IBtk γ e compresa nella sequenza di IBtk in grado di inibire Btk.

3.2 Identificazione e caratterizzazione funzionale delle regioni regolatrici di *IBTK*

Individuati i tre diversi trascritti di IBTK, ci siamo focalizzati sulle loro regioni regolatrici. A tal fine, per i trascritti IBTK α e IBTK β abbiamo clonato, nel plasmide pGL3B al 5' del gene luciferasi, vari frammenti della regione genomica che va da -755 a +22 bp a monte del gene *IBTK* (**fig. 9**).

Il plasmide pGL3B contenente il frammento che va da -67 basi a +22, trasfettato in cellule 293T, non produce alcun aumento dell'attività luciferasica rispetto al controllo (vettore vuoto). Il frammento -82/+22 produce un significativo aumento dell'attività luciferasica, tale frammento comprende una CAAT box (basi -75/-70). Il frammento -157/+22 che possiede anche una GC box, sito di legame per SP1 (basi -87/-81), e il frammento -755/+22, che possiede un sito di legame per NFAT (basi -735/-727), non presentano alcun aumento significativo dell'attività luciferasica in condizioni basali. Il promotore di IBTK α e di IBTK β è quindi un promotore TATA *less* in cui sono

presenti classici siti di legame di fattori trascrizionali tra cui molto importante è la CAAT box.

Hsa	<u>GTGGTTGAA AA-----CA TTACA--AAA GATCATTCA TGTGTATTT CTGCCCTAA- GAATTGGACA -GACTACTG</u>	70
	W V E N I T K D H F M L Y F C P K N W T D L L	
Ppy	<u>GTTGGTTGAA AA-----CA TTACA--AAA GATCATTCA TGTGTATTT CTGCCCTAA- GAATTGGACA -GACTACTG</u>	70
	L V E N I T K D H F M L Y F C P K N W T D L L	
Bta	<u>GTTACAAAAT CA-----TA AAAAGG-AAA GAACATGTT TATTATAGTT TTGCCCTAAA GAATTAGAAA -GACCTACTG</u>	72
	L Q N H K K E R T C C I I V L P	
Cfa	<u>GTTAAAAAT CA-----TA AGAAAGCAAA GACTCTGTTG TTTATAGTT CTGCCCTAAA GAATTGGAAA -GACCTACTG</u>	73
	L K N H K K A K T V L F Y S S A L K N W K D L L	
Mmu	<u>GTTGGTGA AAACCCCTCA GAACAAAAA GACCCTGTTG TGTGTATTT CAGTCCTACA GAATTGGGGA TGATATAGTA</u>	80
Hsa	<u>CATCTTCTT ATTATTTTC TGCATTGAT GTTAGTGA ATTATACATC CTTTCTG--- --GGCAAT TTAGCTCCA</u>	14 4
	H L S Y Y F S A F D V I V N Y T S F S G Q F S L H	
Ppy	<u>CATCTTCTT ATTATTTTC TGCATTGAT GTTAGTGA ATTATACATC CTTTCTG--- --GGCAAT TTAGCTCCA</u>	14 4
	H L S Y Y F S A F D V I V N Y T S F S G Q F S L H	
Bta	<u>GACTTTCTT GTTATTTTC TGCATTGAT GTTAGTGA GTTCTAAGCT CTTTCTTATT AATAGGTAAT TTACCTCCA</u>	15 2
Cfa	<u>GACTTTT--- TTTGTTTC TATATTGAT GTTA-----A ATTCTAAGCT CTTTCTA--- --GATACT CTAGCTTCC</u>	13 9
	D F F C F S I F D V K F	
Mmu	<u>GATCTGT--- TATTTTGT TGCATTGAT ATAA-----TA GTTATGAGCC ---TTCT--- --GATAGC TAACAGTTAT</u>	14 3
Hsa	<u>TAATATTATT TCTTAAATAT GTGCTAAAGA TAGAGTTGAG TTGATAATCC AGCTCTTGTA GAATACAGTA TTACATCCA</u>	22 4
	N I I S	
Ppy	<u>TAATATTATT TCTTAAATAT GTGCTAAAGA TAGAGTTGAG TTGATAATCC CGCTCTTGTA GAATACAGTA TTACATCCA</u>	22 4
	N I I S	
Bta	<u>TAACATTATT TCTTAAATAT GTGCTAAAGA TTGAGTTGGG TTGATAATCC AGCTCTTGTA GAATACATA TTATATGCCA</u>	23 2
Cfa	<u>TGACATT--- TCTCAAATAT ATGCTAAAGA CTGAGTTGGG TTGTAGTCT AGCTCTGATG GTT-----A</u>	20 0
Mmu	<u>CAGTACTGTT TGCTAGCCGT GTGCTAATGG TTG-GTCAGG CCGACGCCT AGTGCAT-TA GCGCACAGTG TCAC-TGCTG</u>	22 0
Hsa	<u>GAAACTGAC TCTAAAATGA TCATTG-TGG ACTATTGGCT ACAAAAGCCA AAGAGTTAAG GCTTGTGATG CAAGTTCTTT</u>	30 3
Ppy	<u>GAAACTGAC TCTAAAATGA TCATTG-TGG ACTATTGGCT ACAAAAGCCA AAGAGTTAAG GCTTGTGATG CAAGTTCTTT</u>	30 3
Bta	<u>GAAATGGCC TCTAAAATA TCAGTA-TAG GCTATT--- TCTGATAC-- AAGTATGATG CACACTATTG CAAGGGCTCA</u>	30 5
Cfa	<u>GAAATGACC CCTAAAATGA TCATTG-TGG ACTATA---- TTTGATGC-- -----A</u>	26 3
Mmu	<u>GAGTTCAGTC ACCACAGAAG TGGTTGCTGG GATGGC---- -TTACTTC-- -----TG AGAAAAGCAC AACTTCCATT</u>	48 5
Hsa	<u>TTGAAATTG TGATATGTTG GAGGGCTCAT ATGTAGCTAT TACTTGATCA TTGTTAGTAT AAACAGATAT TTTCAATTGT</u>	38 3
Ppy	<u>TTGAAATTG TGATATGTTG GAGGGCTCAT ATGTAGCTAT TACTTGATCA TTGTTAGTAT AAACAGATAT TTTCAATTGT</u>	38 3
Bta	<u>TTGTAGCTAT TACTTTAT-- -----CCT TGGTAG-TAT AAATGAT-- --TTTATAT ATATACATAT GGTCACTGTT</u>	37 0
Cfa	<u>ATCAAG-----GCTCAT TTGTATCTAT TATTGATCA TTGATAGTGT AAATGATATG TGCTACTGTT</u>	32 5
Mmu	<u>CTGGGG-----GCTCAT GTTAAACCAT TG-TTGATCA ---ACAGTAT CAACTGACAT TTTACTGTT</u>	34 3
Hsa	<u>GAAACTTG-T GAGCATTG ATCCAATAAT GGTAAAATAA CATCAATAA ATAGAAAACA TTATTATTAC CAGTAACTT</u>	46 2
Ppy	<u>GAAACTTG-T GAGCATTG ATCCAATAAT GGTAAAATAA CATCAATAA ATAGAAAACA TTATTATTAA CAGTAACTT</u>	46 2
Bta	<u>GAAACTTG-T GGCATTG ATCTACTAAT AGTAAAATT CATCAATAA ACACAAAGCA ATATATTAC CTGTA-----T</u>	44 5
Cfa	<u>GAACTATG-T TGCCATTG ATCCAGTAAT AGTAAAATAA CATCAATAA A-----AAGCA ATATATTAC CTGACTCT</u>	40 0
Mmu	<u>GAAACTTAAT AGAAAACATG TTAGGTAAC TTGAAGCAGA GATTAATCT GAGTGATTG TTTCTAGTAC AATGATTCT</u>	42 3
Hsa	<u>TATTAAGCAG AAATTAATG TAATTGATAT AATTCTAGC AAAATGATTT CTCATGGAAT TAACTTTCT CAGAAGAA--</u>	54 0
	M L I D I I S S K M I S H G I K L C Q K K	
Ppy	<u>TATTAAGCAG AAATTAATG TAATTGATAT AATTCTAGC AAAATGATTT CTCATGGAAT TAACTTTCT CAGAAGAA--</u>	54 0
	M L I D I I S S K M I S H G I K L C Q K K	
Bta	<u>TCTTAAGCAG AAATT-----TCTAGC AAAATAGTT TTTATGGAAT TAACTTTCT CAGAAGCAGT</u>	50 6
	M E L N F L R S S	
Cfa	<u>CATTAAGTAG AAATTAATG-----</u>	41 9
	M-----	
Mmu	<u>TAGGAACTA AGATT-----TCTAAG AAACAGTGA GGCAGTACCT AATTGGTTTA C-----</u>	47 5
Hsa	<u>ACCCTGAAA CTAATTGTT TAATTTCTAG CAAAACAGT TCTCATGGAG TTAACCTTC TCAGAAGCAA CGAAAAATGA</u>	62 0
	P L K L I G L I S S K T V S H G V K L S Q K Q R K M	
Ppy	<u>ACCCTGAAA CTAATTGTT TAATTTCTAG CAAAACAGT TCTCATGGAG TTAACCTTC TCAGAAGCAA CGAAAAATGA</u>	62 0
	P L K L I G L I C S K T V S H G V K L S Q K Q R K M	
Bta	<u>AAAATGATT -GGTTAATT TAATTTCTAG AAAATGATT TCTCATGGAG TTAACCTTC TCAGAAGCAA CGAAAAATGA</u>	58 5
	K T D W F N L I S R K M I S H G V K L S Q K Q R K M	
Cfa	<u>-----CCAATCATT TAATTTCTAG CAAGATGATT TCTCATGGAG TTAACCTTC TCAGAAGCAA CGAAAAATGA</u>	48 9
	- - - P I H L I P S K M I S H G V K L S Q K Q R K M	
Mmu	<u>-----TCTAATT TAATTTCTAG AAAATGATT TCTCAGGA TTAACCTTC TCAGAAGCAA CGAAAATGA</u>	54 2
	K I I S H G I K L S Q K Q R K	

Fig. 7 Analisi comparativa dell'introne 24 di *IBTK* tra varie specie. Allineamento di sequenza tra l'introne umano 24 di *IBTK* e le sequenze omologhe di *Pongo pygmaeus*, *Bos taurus*, *Canis familiaris*, e *Mus musculus*. La sequenza umana è

rappresentativa anche per *Pan troglodytes* (>99% di identità di sequenza). La sequenza presente nel riquadro è potenzialmente codificante e corrisponde alla porzione C-terminale dell'isoforma IBTK β , al 5' dell'introne 24, e alla porzione N-terminale dell'isoforma IBTK γ , al 3' dell'introne 24. I segnali di poliadenilazione sono in rosso e sono sottolineati. Il codone iniziale di IBTK γ è in blu. Nucleotidi con <50% di identità sono in grigio, nucleotidi con >50% di identità sono in nero. La porzione prossimale dell'esone 25 è rappresentata come sequenza ombrata.

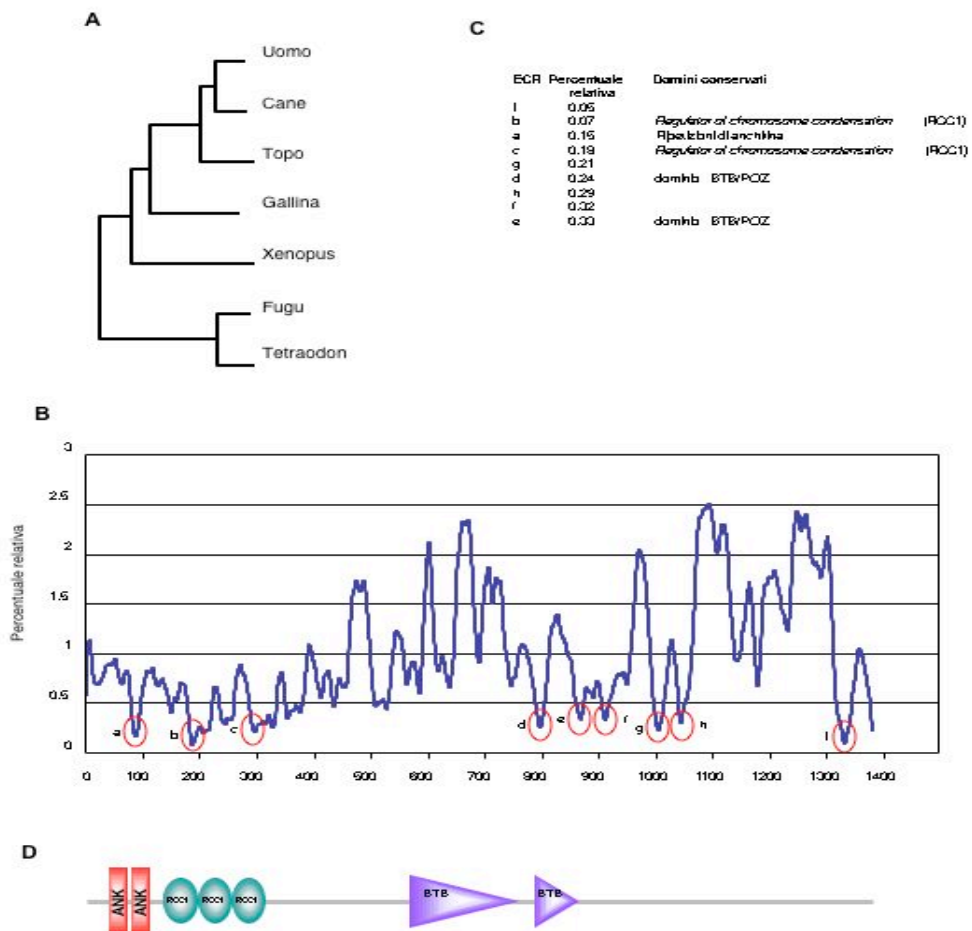


Fig. 8 Analisi evolutiva di IBtk α . (A) Analisi filogenetica della proteina IBtk α .

(B) Il diagramma mostra il tasso di evoluzione locale tra le proteine IBtk α dei vertebrati *H. sapiens*, *C. familiaris*, *M. musculus*, *G. gallus*, *X. tropicalis*, *F. rubripes*, and *T. nigroviridis*. Il valore riportato sull'asse y è una misura del numero di sostituzioni amminoacidiche per residuo, sull'asse x è riportata la corrispondente posizione del residuo nell'allineamento proteico. I cerchi rossi evidenziano le nove ECR (regioni evolutivamente conservate) maggiormente conservate, ossia con una percentuale di sostituzione relativa più bassa. Tali regioni sono indicate come ECRa - ECRi dal N al C-terminale. (C) Lista delle ECR individuate in base al loro tasso di conservazione relative. È indicate anche la corrispondenza con domini proteici noti.

(D) Rappresentazione schematica dei domini proteici conosciuti di IBtk α : ANK= ripetizioni di anchirina; RCC1= regolatore di condensazione cromosomica; BTB= dominio BTB/POZ.

Per analizzare il promotore di IBTK γ abbiamo clonato, nel plasmide pGL3B, i frammenti corrispondenti alle regioni genomiche -155/-5 e -5/-691 rispetto al sito di inizio di trascrizione di IBTK γ (**fig. 9**). Il primo frammento che comprende due siti di legame a C/EBP α non ha prodotto alcun aumento dell'attività luciferasica. Con il secondo frammento, invece, si è osservato un significativo aumento di tale attività, un'analisi bioinformatica (PROSYTE) ha poi identificato in questa regione, che va dall'introne 23 all'introne 24, siti di legame per i fattori trascrizionali IRF, C/EBP, SP1, AP1 e NFAT.

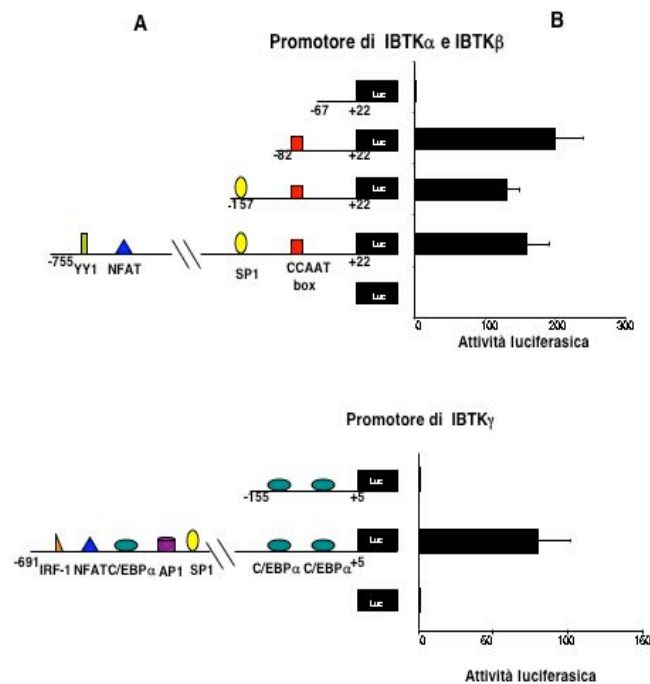


Fig 9. Analisi dei promotori di IBTK. (A) Rappresentazione schematica delle regioni clonate nel vettore pGL3. I numeri indicano le posizioni rispetto al corrispondente sito di inizio dei trascritti IBTK (+1). I simboli indicano la presenza di elementi regolatori trascrizionali su ciascun promotore. (B) Diagramma a barre dell'attività luciferasica ottenuta riportata come incremento rispetto all'attività basale di pGL3. L'attività luciferasica misurata è stata normalizzata con l'attività β -Galattosidasi del plasmide β -Gal cotrasfettato con i nostri costrutti. Le barre indicano la media di cinque esperimenti di trasfezione indipendenti effettuati in duplicato, sono indicate inoltre le deviazioni standard.

In altri saggi luciferasi le stesse regioni poste al 3' del gene luciferasi non hanno prodotto alcun aumento dell'attività luciferasica a dimostrazione che tali regioni, regolatrici in *cis*, non funzionano come *enhancer*.

3.3 Sviluppo di anticorpi anti-IBtk

Per accertarci che i tre trascritti IBTK venissero tradotti in tre isoforme proteiche abbiamo sviluppato anticorpi anti-IBtk (**fig. 10**).

Poiché IBtk è conservata nelle diverse specie, per ottenere un anticorpo anti-IBtk γ e anti-IBtk α abbiamo effettuato un'analisi BLAST tra la sequenza proteica umana e di ratto di IBtk α e individuato la regione di maggiore divergenza. Tale regione corrisponde alla porzione N-terminale di IBtk γ (aa 1-164). Abbiamo quindi prodotto questa porzione di IBtk γ come proteina ricombinante con coda di 6-His e abbiamo immunizzato ratti. Il siero ottenuto riconosce His-IBtk γ in saggi ELISA, funziona per immunoprecipitazione e immunofluorescenza ma non per Western blot.

Per ottenere un anticorpo anti-IBtk α e anti-IBtk β abbiamo individuato mediante un'analisi BLAST regioni di divergenza uomo-gallina e immunizzato galline con il peptide 31B (aa 672-681), peptide corrispondente alla regione di divergenza con maggiore immunogenicità, coniugato con la proteina KLH (Gallus Immunotech). Dagli anticorpi prodotti sono stati purificati gli anticorpi specifici contro il peptide 31B.

Per ottenere un anticorpo che riconoscesse per Western blot IBtk α e IBtk γ , evitando il problema della omologia tra le sequenze proteiche di IBtk

delle diverse specie, abbiamo immunizzato topi *knock-out* per IBtk γ (*knock-out* negli esoni 24-25) con la proteina di fusione GST- IBtk γ in forma denaturata.

Per ottenere un anticorpo che riconoscesse solo IBtk β , abbiamo immunizzato topi *ibtk*^{-/-} con la proteina ricombinante GST-IBtk β 1145-1196, prodotta dalla fusione alla GST della sequenza specifica di IBtk β (aa 1145-1196). Anche in questo caso la proteina è stata somministrata in condizioni denaturanti.

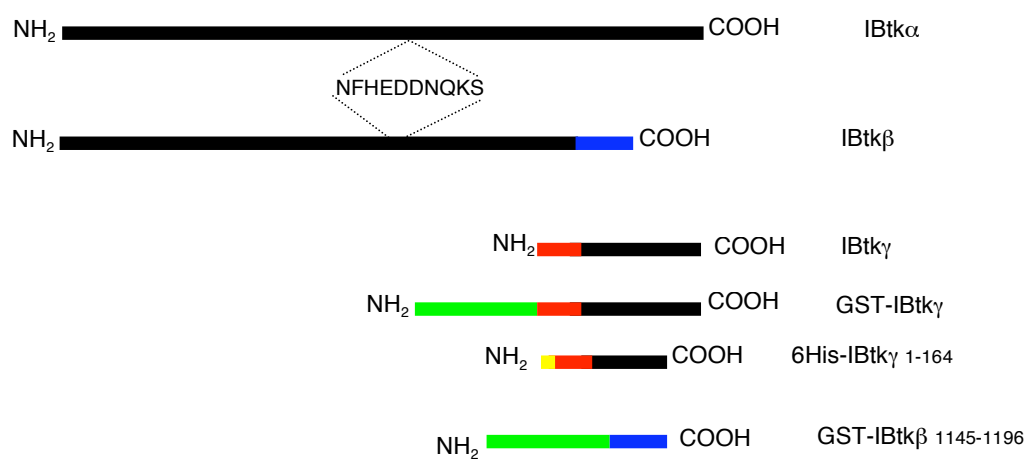


Fig. 10 Schema delle isoforme proteiche di IBtk. In nero è rappresentata la sequenza comune a più isoforme, in rosso la sequenza unica di IBtk γ e in blu la sequenza unica di IBtk β . Sono schematizzate anche le proteine ricombinanti utilizzate per sviluppare gli anticorpi anti-IBtk: in verde è rappresentata la GST e in giallo la coda di 6-istidine. Gli anticorpi prodotti dall'immunizzazione con GST-IBtk γ riconoscono IBtk α e IBtk γ , l'anticorpo ottenuto dall'immunizzazione con GST-IBtk β 1145-1196 è specifico per IBtk β . Tra gli schemi di IBtk α e IBtk β è evidenziato il peptide usato per l'immunizzazione di galline per ottenere un anticorpo contro IBtk α e IBtk β .

Le IgY anti31B riconoscono specificamente le isoforme IBtk α e IBtk β in estratti proteici di cellule DeFew in Western blot. Il legame è specifico, infatti, preincubando l'anticorpo con il peptide 31B, il legame viene spiazzato (**fig. 11A**).

Il siero di topo KO *ibtk* *-/-* riconosce specificamente IBtk α e IBtk γ in estratti di cellule DeFew. Anche in questo caso il legame è specifico: il siero preimmune non riconosce alcuna banda, preincubando il siero immune con la sola GST la banda non viene spiazzata, ma preincubandolo con GST-IBtk γ il legame al filtro viene spiazzato (**fig. 11B**).

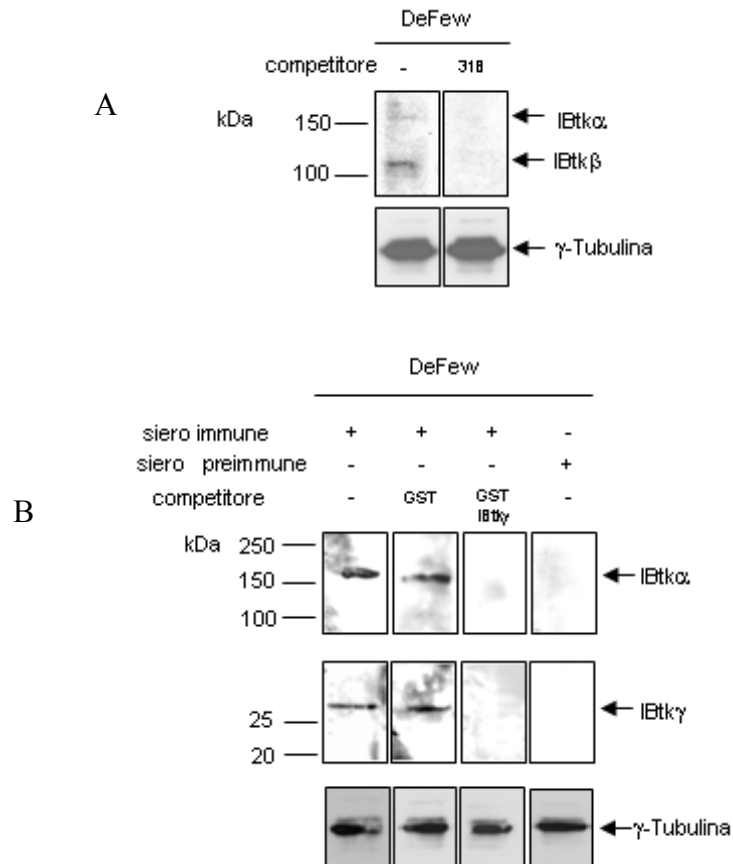


Fig. 11 Isoforme proteiche di IBtk. (A) Visualizzazione di IBtk α e IBtk γ endogene. Lisati cellulari DeFew sono stati separati mediante SDS-PAGE al 8% e al 12% e sottoposti ad *immunoblotting* usando come anticorpo primario (diluito 1:500) siero di topo IBTK-/- immunizzato 4 volte con GST-IBtk γ . L'anticorpo riconosce specificamente IBtk α (150,527 kDa) e IBtk γ (26,314 kDa). Il riconoscimento è specifico poiché preincubando il siero con 60 nmoli/mL di GST le bande non vengono spiazzate e preincubando il siero con 60nmoli/mL di GST-IBtk γ le stesse vengono spiazzate. (B) Visualizzazione di IBtk α e IBtk β endogene. Lisati cellulari DeFew sono stati sottoposti a *immunoblotting* usando come anticorpo primario 10 μ g/mL di IgY anti 31B. L'anticorpo riconosce IBtk α e IBtk β (133,727 kDa) in modo specifico poiché preincubandolo con il peptide 31B (rapporto molare IgY- peptide 1:1000) le bande vengono spiazzate

In seguito abbiamo analizzato la diversa espressione delle tre isoforme in varie linee cellulari umane di tipo linfocitario: DeFew, MC3, Jurkat, NB4 (cellule preieloidi) e in cellule 293T (cellule renali embrionali), HeLa (cellule di epitelio uterino). Non abbiamo riscontrato differenze significative (**fig.12**).

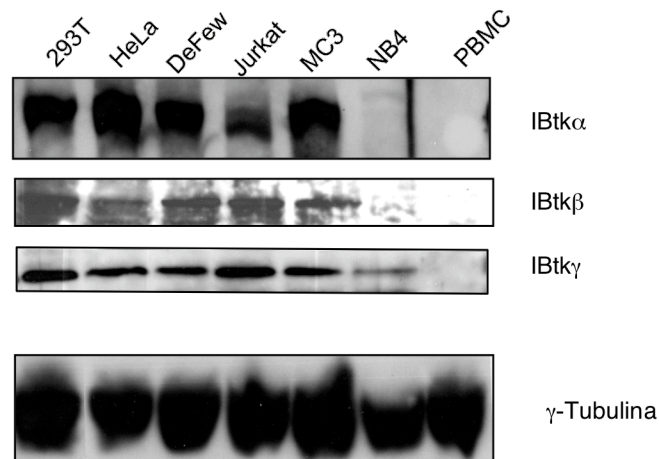


Fig. 12 Espressione di IBtk α IBtk β e IBtk γ in linee cellulari umane. Nei lisati cellulari indicati (50 μ g per IBtk α e IBtk β e 100 μ g per IBtk γ) sono state rilevate IBtk α e IBtk γ con siero di topo IBTK $^{-/-}$ (1:2000) immunizzato 5 volte con GST-IBtk γ e IBtk β con 10 μ g/mL di IgY anti 31B

Abbiamo analizzato poi la diversa espressione delle isoforme proteiche in organi di topo. Il topo possiede le isoforme IBtk α , IBtk γ ma non l'isoforma IBtk β , come si può vedere dall'assenza della banda a 130 kDa.

IBtk γ è molto espressa nella milza ed è presente anche in timo, rene e polmone.

IBtk α è molto espressa nel fegato ed è presente anche in milza, timo e polmone (**fig.13**).

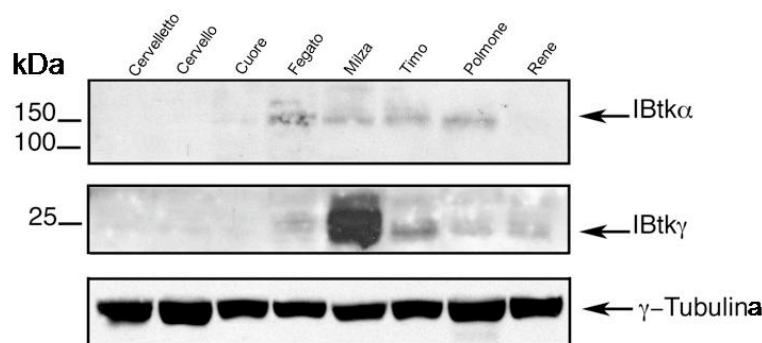


Fig. 13 Espressione di IBtk α e IBtk γ in organi murini. In 50 μ g di lisati cellulari di cervello, cervelletto, cuore, fegato, milza, timo, polmone e rene di topi *wild-type* C57BL abbiamo rilevato IBtk α con 10 μ g/mL di IgY anti 31B e IBtk γ con siero di topo IBTK $^{-/-}$ (1:2000) immunizzato 5 volte con GST-IBtk γ .

3.4 Modificazioni post-traduzionali di IBtk α e o IBtk β

Oltre alla banda di 150kDa abbiamo riscontrato negli esperimenti effettuati la presenza di bande aggiuntive di IBtk α e o IBtk β :

- usando anticorpi anti-IBtk γ , che quindi riconoscono la parte C-terminale di IBtk α e non IBtk β , abbiamo rivelato due bande: una di circa 75kDa e un'altra di circa 50kDa. Queste bande vengono riconosciute dal siero di ratto immunizzato con la proteina His-IBtk γ corta: vengono infatti immunoprecipitate da tale anticorpo in esperimenti di marcatura metabolica su cellule DeFew e non dal siero di ratto preimmune (**fig. 14A**). Vengono inoltre visualizzate in esperimenti di Western blot su estratti cellulari DeFew utilizzando il siero anti-IBtk γ di topo *ibtk $^{-/-}$* , vengono spiazzate specificamente, preincubando il siero con la proteina GST-IBtk γ , non spiazzate dalla sola GST e non riconosciute dal siero preimmune (**fig. 14B**). La banda a circa 75 kDa è visualizzata in Western blot, utilizzando come anticorpo primario il siero di topo *ibtk $^{-/-}$* anti-IBtk γ , anche in estratti di cellule 293T trasfettate con il

plasmide di espressione 3xFlag-IBtk α non è presente invece in estratti non trasfettati (**fig. 14C**).

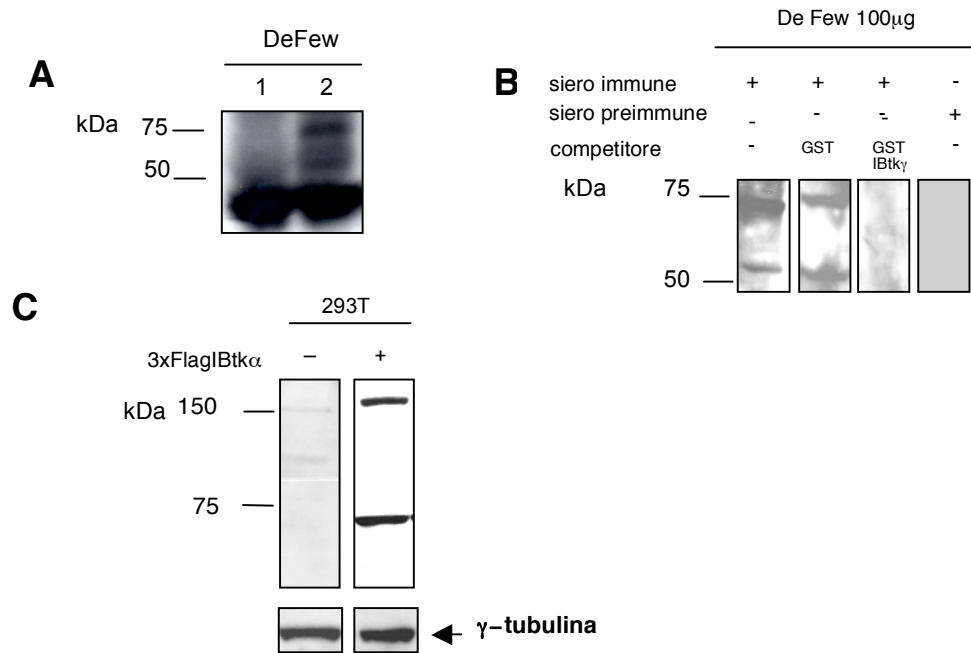


Fig.14 Individuazione di altre isoforme proteiche di IBtk α . (A) Marcatura metabolica di cellule DeFew seguita da immunoprecipitazione con siero di ratto preimmune (1) e siero di ratto anti-IBtk (2), due bande tra 75 e 50 kDa sono immunoprecipitate specificamente dal siero di ratto immunizzato. (B) Western blot su lisati cellulari DeFew separati mediante SDS-PAGE al 8%, come anticorpo primario (diluito 1: 500) è stato usato siero di topo *ibtk*^{-/-} immunizzato 4 volte con GST-IBtk γ . L'anticorpo riconosce specificamente oltre ad IBtk α (fig.10) anche due bande tra 75 e 50 kDa. Il riconoscimento è specifico poiché preincubando il siero con 60 nmoli/mL di GST le bande non vengono spiazzate e preincubando il siero con 60nmoli/mL di GST-IBtk γ le stesse vengono spiazzate. (C) Western blot su lisati cellulari 293T trasfettati o meno con il plasmide 3XFlagIBtk α separati mediante SDS-PAGE al 8%, come anticorpo primario (diluito 1: 500) è stato usato siero di topo *ibtk*^{-/-} immunizzato 4 volte con GST-IBtk γ . Oltre alla banda attesa di 150kDa è stata rilevata nel trasfettato anche una banda di circa 75 kDa.

Effettuando Western blot sempre con l'anticorpo anti IBtk γ sviluppato nel topo *ibtk* *-/-* sulle linee cellulari umane B (DeFew), su linee cellulari T (Jurkat) e cellule primarie (PBMC) abbiamo riscontrato una diversa espressione delle forme di IBtk α di 75 e 50 kDa : nei PBMC dove è assente la forma canonica di 150kDa è molto espressa la forma di 75 kDa e non è presente la forma di 50 kDa, nelle DeFew e nelle Jurkat sono presenti tutte e tre le forme di IBtk α (**fig. 15**).

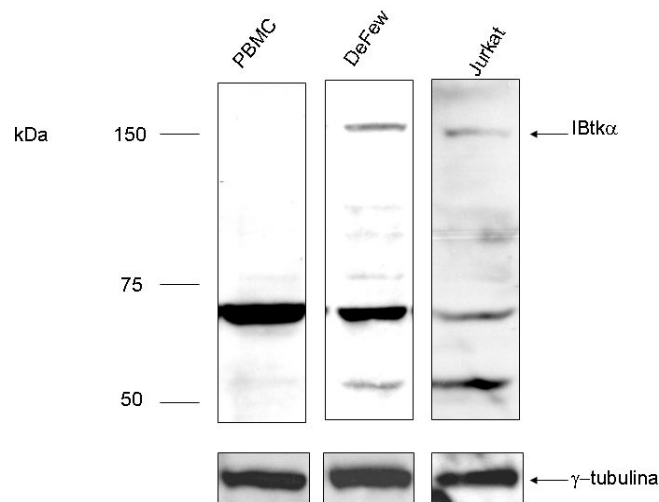


Fig. 15 Espressione delle isoforme di IBtk α . In 100 μ g di lisati cellulari PBMC, DeFew e Jurkat sono state rilevate le diverse isoforme di IBtk α usando siero di topo *ibtk* *-/-* immunizzato 4 volte con GST-IBtk γ .

- Usando invece l'anticorpo anti-IBtk sviluppato in gallina, anticorpo che riconosce la sequenza NFHEDDNQKS aa 672-681 di IBtk α e IBtk β , abbiamo rilevato in estratti DeFew una banda di circa 50kDa e una banda di circa 75kDa anche in questo caso spiazzate preincubando l'anticorpo con il peptide 31B (**fig. 16A**). Effettuando inoltre un'immunoprecipitazione con il siero di ratto immunizzato con la proteina His-IBtk γ di un lisato di cellule DeFew seguita da Western blot con l'anticorpo sviluppato in gallina,

rileviamo la banda di circa 75kDa ma non quella di 50kDa (**fig. 16B**). Usando l'anticorpo specifico contro IBtk β in esperimenti di Western blot su estratti di cellule 293T trasfettate e non con il plasmide 3xFlag-IBtk β , abbiamo riscontrato la presenza, oltre che della forma a 130 kDa, anche di una forma maggioritaria di circa 50kDa ma di nessuna banda di 75kDa (**fig. 16C**).

Quindi la forma di circa 75kDa riconosciuta dagli anticorpi specifici per la porzione C-terminale di IBtk α e dall'anticorpo di gallina specifico per la regione centrale della proteina è la stessa come confermato dall'esperimento di immunoprecipitazione con un anticorpo C-terminale e di rivelazione con l'anticorpo di gallina (**fig. 16B**). Inoltre tale banda non è rilevata dall'anticorpo specifico per IBtk β . Ciò è compatibile con l'esistenza di un taglio proteolitico di IBtk α nella regione immediatamente precedente l' aa 672 (primo amminoacido della sequenza con cui sono state immunizzate le galline).

La banda di circa 50 kDa evidenziata sia dall'anticorpo di gallina sia dall'anticorpo specifico di IBtk β è compatibile con l'esistenza dello stesso taglio proteolitico (ossia nella regione immediatamente precedente all'aa 672) in IBtk β .

La banda di circa 50 kDa rilevata dai due anticorpi specifici (l'anticorpo sviluppato in topo e quello in ratto) verso la porzione C-terminale potrebbe derivare da un ulteriore taglio della banda di 75 kDa.

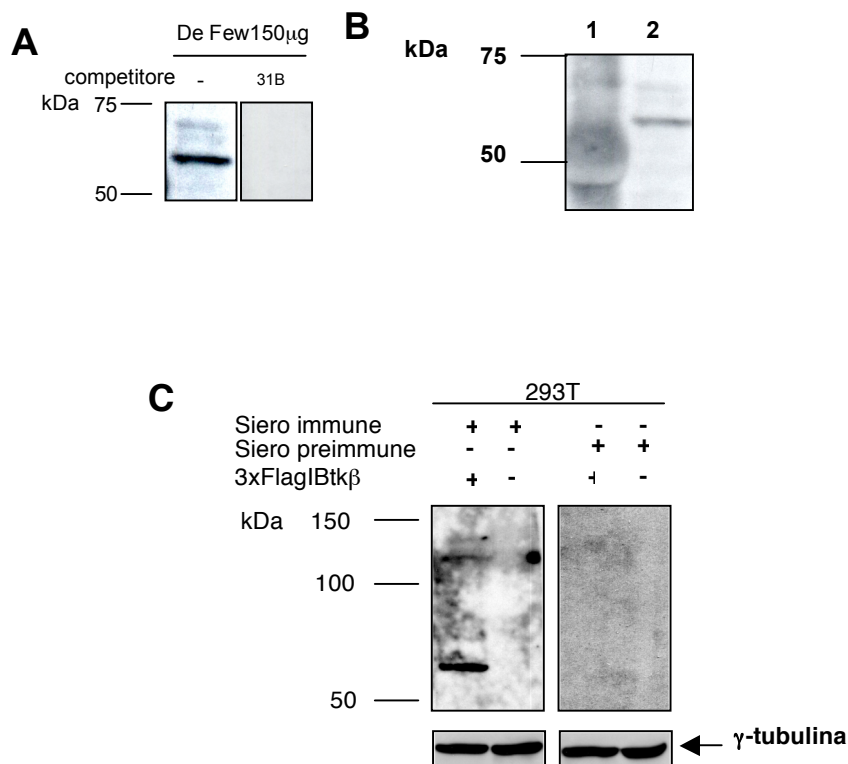


Fig.16 Individuazione di altre isoforme proteiche di IBtk α e o IBtk β . (A) Mediante Western blot con le IgY anti 31B si rivelano oltre alle bande di IBtk α (150 kDa) e IBtk β (130kDa) altre due bande che vengono spiazzate dal peptide 31B. (B) Western blot usando come anticorpo primario IgY anti 31B; corsia 1= IP di lisati DeFew con anti IBtk sviluppato in ratto; corsia 2= lisato DeFew 150µg. (C) Western blot usando come anticorpo primario siero di topo preimmune o immunizzato con la proteina GST-IBtk β 1145-1196 su 50µg di lisati di cellule 293T trasfettate o no con il plasmide 3xFlagIBtk β .

3.5 Localizzazione cellulare di IBtk α , IBtk β e delle loro forme proteolitiche.

Mediante analisi informatica, come già detto, abbiamo individuato in IBtk α e IBtk β tra le regioni maggiormente conservate, due domini RCC1 ossia domini di regolazione trascrizionale. Tale informazione suggerirebbe una localizzazione nucleare delle due proteine. Inoltre mediante il taglio proteolitico da noi ipotizzato, IBtk α e IBtk β perderebbero i due domini RCC1. Abbiamo quindi preparato estratti nucleari e citosolici di cellule MC3 e DeFew e analizzato l'espressione in tali compartimenti di IBtk α di IBtk β e delle forme

proteolitiche di entrambe mediante Western blot. Come è possibile vedere dalla figura 17, la forma di 150 kDa di IBtk α è risultata localizzata esclusivamente nel nucleo, mentre la forma di 130kDa di IBtk β si distribuisce tra citoplasma e nucleo. Le forme di 75 kDa di IBtk α e di 50kDa di IBtk β sono, come atteso, presenti nel citoplasma.

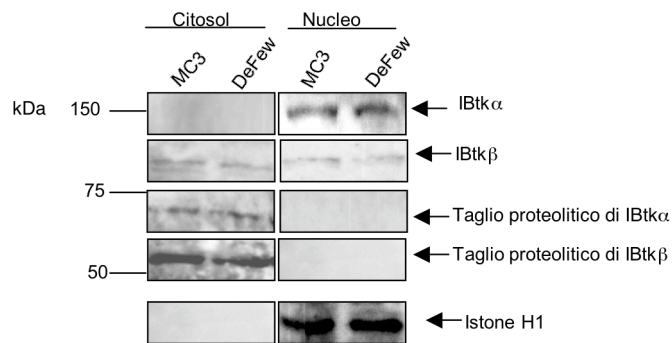


Fig. 17 Localizzazione di IBtk α e IBtk β . Western blot su estratti citosolici e nucleari di cellule MC3 e di cellule DeFew (50 μ g) usando il siero di topo *ibtk*^{-/-} (1: 2000) immunizzato 5 volte con GST-IBtk γ per rivelare IBtk α e IgY anti 31B per rivelare IBtk β e le forme proteolitiche. Come marcatore nucleare è stato utilizzato l'anti-istone H1 (Santa Cruz).

CAPITOLO 4

DISCUSSIONE

In questo lavoro abbiamo caratterizzato il gene umano *IBTK* la cui organizzazione fisica e funzionale non è mai stata studiata. Tale gene mappa in una regione di frequenti aberrazioni cromosomiche in disordini linfoproliferativi e codifica per la proteina IBtk γ , proteina individuata nel 2001 nel nostro laboratorio, inibitrice della tirosina chinasi Btk (*Bruton's tyrosine kinase*), chinasi implicata nell'agammaglobulinemia legata al sesso (XLA). Ciò fa supporre un coinvolgimento del gene *IBTK* in patologie del sistema immunitario.

Abbiamo individuato una complessa organizzazione del gene *IBTK*: sono presenti due promotori, tre differenti trascritti di cui due deriverebbero da un fenomeno di *splicing* alternativo. I trascritti individuati sono: IBTK α , che consta di 29 esoni, IBTK β formato dagli esoni 1-24 di IBTK α e da parte dell'introne 24 di IBTK α , che, non essendo soggetto in questo caso a *splicing*, viene tradotto fino ad un codone di stop, e l'ultimo trascritto IBTK γ di 5 esoni il primo dei quali corrisponde all'esone 25 di IBTK α più parte dell'introne 24. I primi due trascritti sono regolati da un promotore situato al 5' del gene, invece IBTK γ da un promotore situato nella regione tra l'introne 23 e l'introne 24. In entrambi i promotori sono stati individuati siti di legame del fattore di trascrizione NFAT, importante nella regolazione di cellule del sistema immunitario. In condizioni basali la presenza di tale sito di legame non sembrerebbe significativa, ma tale fattore è attivato in seguito ad aumento della concentrazione di Ca⁺⁺ intracellulare (64). In futuro approfondiremo quindi la sua rilevanza mediante saggi luciferasi in presenza di agenti che producono un

incremento del Ca^{++} intracellulare, mediante esperimenti di EMSA e di immunoprecipitazione della cromatina.

Il gene *IBTK* è risultato essere evolutivamente molto conservato e conservata tra le differenti specie è anche la presenza delle diverse isoforme, soprattutto di $\text{IBTK}\alpha$ e $\text{IBTK}\gamma$, ciò potrebbe essere indice dell'importanza della funzione rivestita dalle corrispettive proteine. Da un'analisi bioinformatica è emerso che i domini evolutivamente più conservati sono: un dominio al C-terminale, presente in $\text{IBtk}\alpha$ e $\text{IBtk}\gamma$, non presente in letteratura ma coinvolto nell'inibizione dell'attività chinasi di Btk, domini RCC1, una ripetizione di anchirine e domini BTB/POZ, presenti in $\text{IBtk}\alpha$ e $\text{IBtk}\beta$. La presenza del dominio RCC1 farebbe ipotizzare un coinvolgimento di $\text{IBtk}\alpha$ e $\text{IBtk}\beta$ nella regolazione trascrizionale. RCC1 è infatti una proteina che si lega alla cromatina e ne regola la condensazione, è coinvolta nel processo regolatorio per cui durante il ciclo cellulare la mitosi non inizia prima che sia finita la fase di replicazione (65, 66, 67, 68). RCC1 è, inoltre, uno scambiatore di guanina per Ran, una GTPasi coinvolta nel trasporto nucleocitoplasmatico (69, 70). Anche il dominio BTB/POZ è coinvolto nella regolazione trascrizionale, è infatti un dominio di interazione proteina-proteina spesso presente in regolatori trascrizionali coinvolti nello sviluppo (71, 72).

Per quanto concerne le proteine codificate dai tre trascritti *IBTK*, abbiamo riscontrato la presenza di tutte e tre le isoforme in quasi tutte le linee cellulari immortalizzate umane, solo nelle cellule NB4 è presente unicamente $\text{IBtk}\gamma$. Quest'ultimo dato potrebbe essere interessante essendo le cellule NB4 cellule preieloidi e essendo Btk coinvolto nello sviluppo delle cellule B. Comunque la presenza di tutte e tre le isoforme in cellule immortalizzate non

collegate al sistema immunitario non è molto significativa: le cellule analizzate sono infatti cellule tumorali aventi un cariotipo alterato, basti pensare che le cellule HeLa possiedono 3 copie del cromosoma 6, cromosoma in cui è presente il nostro gene. Un quadro significativo dell'espressione delle nostre proteine è dato dagli organi murini: IBtk γ risulta presente soprattutto nella milza e nel timo, importanti organi del sistema immunitario a conferma della sua funzione inibitrice della proteina Btk, e IBtk α risulta presente soprattutto nel fegato ma anche nel polmone, nel timo e nella milza, in organi, quindi, o del sistema immunitario o comunque ricchi di macrofagi residenti (cellule Kupffer nel fegato e macrofagi interstiziali e alveolari nel polmone). IBtk β è assente nel topo, a conferma dell'analisi comparativa dell'introne 24 secondo la quale non è presente alcun sito di poliadenilazione in tale regione murina.

Dati preliminari indicano che IBtk α e IBtk β sono soggette a taglio proteolitico dando luogo a proteine di rispettivamente 75 kDa e 50 kDa prive dei 2 domini RCC1. Abbiamo inoltre visto che IBtk α è localizzata nel nucleo, IBtk β sia nel nucleo che nel citoplasma e le forme derivate da proteolisi sono localizzate nel citoplasma. La localizzazione nucleare di IBtk α e di IBtk β , le due isoforme che possiedono domini RCC1 e BTB/POZ concorrerebbe a far ipotizzare un loro coinvolgimento nella regolazione trascrizionale. Va inoltre sottolineato come anche BTK è, se pur in piccola parte, presente nel nucleo e IBtk α potrebbe essere implicata nella sua esportazione. IBtk α e IBtk β potrebbero quindi agire da proteine *shuttle* che inibiscono chinasi e/o regolano il segnale mediato da Ras nella membrana cellulare e traslocano nel nucleo per regolare l'espressione genica. In effetti, IBtk α e IBtk β potrebbero trasdurre segnali dalla membrana al nucleo in analogia con le proteine STAT e

le proteine che interagiscono con BTK come TFII-I (35, 36). Dato interessante è anche l'assenza nelle uniche cellule primarie umane analizzate, i PBMC, della forma di IBtk α di 150kDa e della significativa presenza della forma di 75kDa.

In futuro analizzeremo dettagliatamente la funzione di IBtk α di IBtk β e IBtk γ , il loro coinvolgimento nella regolazione di Btk e le modificazioni post-traduzionali cui sono sottoposte.

CAPITOLO 5

BIBLIOGRAFIA

1. Liu W *et al.* (2001) *Nat. Immunol* 10, 939-946
2. de Weers M *et al.* (1994) *J Biol Chem* 269, 23857-23860
3. de Weers M *et al.* (1993) *Eur J Immunol* 23, 3109-3114
4. Satterthwaite *et al.* (1998) *Semin in Immunol* 10, 309-316
5. Kersseboom R *et al.* (2003) *J Exped Med* 198, 91-98
6. Vassilev A *et al.* (1999) *J Biol Chem* 274, 1646-1656
7. Uckun FM *et al.* (2007) *British Journal of Haematology* 136, 574-589
8. Vascotto F *et al.* (2007) *Curr Opin Immunol* 19, 93-98
9. Donahue AC *et al.* (2003) *J Immunol* 170, 5851-5860
10. Yamada H *et al.* (1993) *J Exp Med* 177, 1613-1621
11. Bajpai UD *et al.* (2000) *J Exp Med* 191, 1735-1744
12. Petro JB *et al.* (2000) *J Exp Med* 191, 1745-1754
13. Iwaki S *et al.* (2005) *J Biol Chem* 280, 40261-40270
14. Ueki K *et al.* (2002) *Mol Cell Biol* 22, 965-977
15. Fruman DA *et al.* (2002) *Semin in Immunol* 14,7-18
16. Scharenberg AM *et al.* (1998) *Cell* 94, 5-8
17. Schaeffer EM *et al.* (2000) *Curr Opin Immunol* 12, 282-288
18. Fruman DA *et al.* (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 359-364
19. Hardy RR *et al.* (2007) *Immunity* 26, 703-714
20. Mårtensson IL *et al.* (2007) *Curr Opin Immunol* 19, 137-142
21. Geier JK *et al.* (2006) *Semin in Immunol* 18, 31-39
22. Jumaa H *et al.* (1999) *Immunity* 11, 547-554
23. Middendorp S *et al.* (2002) *J Immunol* 168, 2695-2703
24. Xu S *et al.* (2007) *Blood* 109, 3377-3384
25. Mohamed AJ *et al.* (2000) *J Biol Chem* 275, 40614-40640
26. Nore BF *et al.* (2000) *Eur J Immunol* 30, 145-154
27. Sato S *et al.* (1994) *J Exp Med* 6, 2101-2111
28. Tsukada S *et al.* (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91,11256-11260
29. Langhans-Rajasekaran SA *et al.* (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 8601-8605
30. Jiang, Y. *et al.* (1998) *Nature* 395, 808-813
31. Mao J *et al.* (1998) *EMBO J* 17, 5638-5646
32. Fluckiger AC *et al.* (1998) *EMBO J* 17, 1973-1985
33. Doyle SL *et al.* (2007) *J Biol Chem* in press
34. Satterthwaite AB *et al.* (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 13152-13157
35. Yang W *et al.* (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 604-609
36. Novina CD *et al.* (1999) *Mol Cell Biol* 19, 5014-5024
37. Jumaa H *et al.* (2003) *Nature* 423,452-456
38. Flemming A *et al.* (2003) *Nat Immunol.* 4,38-43
39. Jumaa H *et al.* (2001) *Eur J Immunol* 31, 2164-2169
40. Uckun FM *et al.* (1996) *Science* 273, 1096-1100
41. Kawakami Y *et al.* (1997) *Proc Natl Acad Sci USA*.94, 3938-3942
42. Vetrie D *et al.* (1993) *J Med Genet* 30,452-453
43. Tsukada S *et al.* (1993) *Cell* 72, 279-90
44. Rawlings DJ *et al.* (1993) *Science* 261,358-361
45. Thomas JD *et al.* (1993) *Science* 261, 355-358

46. Fruman DA *et al.* (2000) *Immunity* 13, 1-3
47. de Weers M *et al.* (1994) *Hum Mol Genet* 3,161-166
48. Mitelman F *et al.* (1997) *Nat Genet* 15, 417-474
49. Inoue M *et al.* (2002) *Am J Pathol* 161, 1507-1513
50. Scala G. *et al.* (1990) *J Exp Med* 172,61-68
51. Roussel MJS *et al.* (2001) *Oncogene* 20, 7287-7291
52. Graham FL *et al.* (1977) *J Gen Virol* 36, 59-74
53. Masters JR *et al.* (2002) *Nat Rev Cancer* 2, 315-319
54. Corpet F *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res* 16, 10881-10890
55. Simon AL *et al.* (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2912-2917
56. Galtier N *et al.* (1996) *Comput Applic Biosci* 12, 543-548
57. Yang Z *et al.* (2000) *Genetics* 155, 431-449.
58. Hulo N *et al.* (2004) *Nucleic Acids. Res* 32, D134-D137
59. Letunic I *et al.* (2006) *Nucleic Acids Res* 34, D257-D260
60. Bork P *et al.* (1993) *Proteins* 17, 363-374
61. Dasso M *et al.* (1993) *Trends Biochem Sci* 18, 96-101
62. Bardwell VJ *et al.* (1994) *Genes Dev* 8,1664-1677
63. Ahmad KF *et al.* (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95,12123-12128
64. Gwack Y *et al.* (2007) *Cell Calcium* 42, 145-156
65. Ohtsubo M *et al.* (1989) *J Cell Biol* 109, 1389-1397
66. Dasso M *et al.* (1992) *Mol Cell Biol* 12, 3337-3345
67. Khanna H *et al.* (2005) *J Biol Chem* 280, 33580-33587
68. He S *et al.* (2007) *Vision research* in press
69. Kurisaki A *et al.* (2006) *Mol Cell Biol* 26, 1318-1332
70. Roig J *et al.* (2002) *Genes Dev* 16, 1640-1658
71. Qi J *et al.* (2006) *Mol Cell Biochem* 290, 159-167
72. Xu J *et al.* (2004) *Int J Mol Med* 13, 193-197

RINGRAZIAMENTI

Alla fine del mio lavoro di tesi ritengo doveroso ringraziare tutte le persone la cui esperienza e il cui incoraggiamento sono risultati indispensabili per il raggiungimento degli obiettivi prefissatimi.

Ringrazio, prima di tutto il prof. G. Scala, che mi ha seguito e sostenuto in questi tre anni di dottorato, la prof.ssa I. Quinto, che mi ha sempre incoraggiato, la prof.ssa G. Russo per i preziosi consigli, la dr.ssa C. Spatuzza e il dr. M. Schiavone, il dr. M. Sardiello, la prof.ssa R. Capparelli e la dr.ssa I. Ventimiglia che hanno collaborato con me per il completamento di questo lavoro. Ringrazio tutte le persone del mio laboratorio che mi hanno aiutato continuamente.

Sono riconoscente al Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche che mi ha consentito di svolgere il lavoro di tesi e di utilizzare tutte le attrezzature scientifiche del Dipartimento stesso.

Un sentito “grazie” va inoltre alla mia famiglia, ad Alfonso e a tutti i miei amici per il sostegno morale che non mi hanno mai fatto mancare.