

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

“ FEDERICO II ”



FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA AVANZATA

XXII ciclo

***CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DELLE ISOFORME
DELL'mRNA SPECIFICO DEGLI ALLELI DEL GENE DQA1
ASSOCIATI A SINDROMI AUTOIMMUNI***

Candidata

Dott.ssa Alessandra Citro

Tutor

Prof. Giuseppe Saccone

Cotutor

Dott.ssa Giovanna Del Pozzo

Coordinatore

Prof. Luciano Gaudio

ANNO ACCADEMICO 2008-2009

INDICE

INTRODUZIONE	4
I PARTE	5
IL COMPLESSO MAGGIORE D'ISTOCOMPATIBILITÀ (MHC II)	5
1. Struttura degli antigeni MHCII	5
2. Funzione degli antigeni MHCII	5
3. Organizzazione dei geni MHCII	6
4. Regolazione trascrizionale dei geni MHCII: CIITA il "master controller" dell'espressione dei geni di classe II	7
5. Polimorfismo allelico dei geni MHC II e sindromi autoimmunitarie	9
II PARTE	11
REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE	11
1. Turnover degli mRNAs e controllo traduzionale	11
2. Meccanismi che generano la variabilità della 3'UTR: splicing differenziale e poliadenilazione alternativa	13
III PARTE	17
REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE DEI GENI MHC II	17
OBIETTIVO DELLA TESI	19
MATERIALI E METODI	20
1. Colture cellulari e reagenti	21
2. Analisi citofluorimetrica	21
3. Estrazione dell'RNA	22
4. 3'RACE PCR	22
5. qRT-PCR	23
6. Gradiente di saccarosio	25
RISULTATI	26
1. Polimorfismo della regione 3'UT del trascritto di DQA1*0505	27
2. Analisi dello splicing alternativo nella 3'UTR dell'mRNA di DQA1*0505	27
3. Analisi della poliadenilazione alternativa nella 3'UTR dell'mRNA di DQA1*0505	31
4. Combinazione di splicing differenziale e poliadenilazione alternativa nella 3'UTR dell'mRNA di DQA1*0505 in SWEIG007	34

5. La stimolazione di SWEIG007 con IFN- γ non induce un incremento in superficie delle molecole MHCII.	36
6. Analisi del pattern delle isoforme del trascritto di DQA1*0505 in seguito a stimolazione con IFN- γ .	41
7. Analisi del profilo polisomale delle isoforme di DQA1*0505	43
8. Analisi della stabilità delle isoforme di DQA1*0505	46

DISCUSSIONE **48**

BIBLIOGRAFIA **57**

INTRODUZIONE

I PARTE

IL COMPLESSO MAGGIORE D'ISTOCOMPATIBILITÀ (MHCII)

1. Struttura degli antigeni MHCII

Gli Antigeni di Istocompatibilità di classe II sono glicoproteine transmembrana espresse sulla superficie di cellule specializzate del sistema immunitario. Essi sono presenti sotto forma di eterodimeri, costituiti da una catena α (32-34 kD) e una catena β (29-32 kD), tenute insieme da interazioni estremamente forti di tipo non covalente. Generalmente in queste molecole si distinguono un dominio extracellulare, un dominio transmembrana e un dominio intracitoplasmatico. Le porzioni extracellulari delle catene α e β sono divise in due segmenti indicati rispettivamente $\alpha 1$ e $\alpha 2$ o $\beta 1$ e $\beta 2$. La regione che lega il peptide antigenico é quella che si forma dall' interazione tra i segmenti $\alpha 1$ e $\alpha 2$, quali si ripiegano a formare una sorta di tasca. Le estremità carbossi-terminali sono costituite da un segmento di amminoacidi idrofobici che attraversano la membrana; entrambe le catene terminano con una sequenza di residui amminoacidici basici a cui segue una coda idrofilica intracitoplasmatica (1).

2. Funzione degli antigeni MHCII

Come precedentemente accennato, gli antigeni MHCII sono espressi sulla superficie di cellule specializzate del sistema immunitario definite *Antigen Presenting Cells*, (APC) quali linfociti B, cellule epiteliali timiche, macrofagi e cellule dendridiche. Essi, tuttavia, possono anche essere indotti dalla stimolazione con IFN- γ o altre citochine in APCs non professionali come fibroblasti, cellule endoteliali, cellule T e alcune cellule tumorali.

Le molecole MHCII hanno un'importante funzione immunologica. Esse legano frammenti peptidici derivanti da proteine extracellulari e li presentano ai linfociti T helper, attivando in questo modo la risposta immunitaria. Più precisamente, le proteine internalizzate dalle APCs vengono degradate in peptidi nei compartimenti endosomali/lisosomali; tali peptidi sono caricati sulle molecole MHCII neosintetizzate e trasportati sulla superficie cellulare dove vengono presentati ai linfociti T CD4⁺. Il complesso MHC-peptide viene riconosciuto dal recettore TCR presente sulla superficie dei linfociti T CD4⁺ e attiva varie risposte funzionali, quali proliferazione e differenziazione in cellule effettrici.

3. Organizzazione dei geni MHCII

Gli antigeni MHCII sono codificati dai geni del Complesso Maggiore d'Istocompatibilità di classe II. Il locus MHC umano occupa un esteso segmento genomico del braccio corto del cromosoma 6, della lunghezza di circa 3500 Kb, all'interno del quale sono compresi i geni MHCII, MHCI, i geni per il complemento e anche geni codificanti per proteine da shock termico e per citochine (TNF, LT). Nell'uomo lo studio della regione MHC di classe II ha consentito l'identificazione di tre loci DP, DR e DQ, all'interno dei quali possono esistere due o tre geni funzionali per la catena β , e solitamente un gene funzionale per la catena α . L'uso di più di un gene funzionale per la catena β permette ad alcuni prodotti dei geni di classe II di essere espressi in più di due forme alleliche su di una singola cellula. Di solito un individuo può esprimere da 10 a 20 differenti prodotti dei geni di classe II per ogni cellula. All'interno della regione di classe II sono compresi anche altri geni, denominati DMA e DMB, che codificano una molecola eterodimerica, in grado di favorire il legame del peptide antigenico alle molecole di classe II. In tutti i geni

MHC umani lo schema generale di organizzazione è molto simile: il primo esone codifica per la sequenza leader, che indirizza la proteina nascente verso il reticolo endoplasmatico, mentre gli altri quattro esoni codificano per ognuna delle regioni extracellulari, $\alpha 1$ e $\alpha 2$ oppure $\beta 1$ e $\beta 2$, per la regione transmembrana e intracitoplasmatica e infine un esone per la 3'UTR.

4. Regolazione trascrizionale dei geni MHCII: CIITA il “master controller” dell’espressione dei geni di classe II

L’espressione dei geni MHCII, sia costitutiva che inducibile, è regolata principalmente a livello trascrizionale. Tutti i geni di classe II sono strettamente coregolati a livello trascrizionale. Tale coregolazione, è dovuta al fatto che essi condividono la stessa struttura del promotore e lo stesso apparato trascrizionale. L’elemento regolatore più importante, altamente conservato, è il modulo S-Y. Questo modulo, costituito dai motivi S X ed Y, è conservato non solo a livello di sequenza, ma anche a livello di posizione e orientamento in modo da esibire un preciso allineamento stereospecifico sulla molecola di DNA (2). La Y box è composta da 10 nucleotidi, approssimativamente a 40-90 basi dal sito di inizio della trascrizione. La X box, successivamente distinta in due parti X_1 e X_2 che parzialmente si sovrappongono e lunghe rispettivamente 15 e 8 nucleotidi, è localizzata a monte della Y. A monte di X_1/X_2 c’è un altro motivo altamente conservato, conosciuto come S box, lungo 7 coppie di basi e incluso in una box più grande denominata Z o anche W (3). Tali regioni regolatrici rappresentano siti di binding di più di venti fattori proteici che formano un complesso chiamato “enhanceosoma” dell’MHCII. All’interno dell’enhanceosoma, la X_1 box è riconosciuta dal fattore RFX, una proteina trimerica composta da RFX5, RFXANK e RFXAP, la X_2 box è occupata

dal fattore CREB, e la Y box è legata dal fattore di trascrizione NF-Y. L'assemblaggio dell'enhanceosoma sul modulo S-Y è altamente sinergico e richiede interazioni cooperative tra tutti i suoi componenti. L'occupazione delle sequenze S-Y da parte dell'enhanceosoma è il pre-requisito per l'attivazione dell'espressione dei geni MHCII. L'enhanceosoma, tuttavia, non può attivare la trascrizione in assenza del trans-attivatore di classe II (CIITA). CIITA è una proteina che non lega direttamente il DNA, espressa costitutivamente nelle APCs professionali e inducibile in quelle non professionali (3). Il pattern d'espressione dei geni di classe II è strettamente legato all'espressione di CIITA (4). CIITA media tutti gli eventi molecolari richiesti per l'attivazione della trascrizione di questi geni e pertanto è stato definito 'master controller' dell'espressione dei geni MHC II. Il modo in cui CIITA funziona da promotore trascrizionale è ancora una questione aperta. Esso viene reclutato dai geni bersaglio (5) tramite interazioni proteina-proteina con diversi componenti dell'enhanceosoma (6). Inoltre, CIITA può interagire con diversi fattori dell'apparato trascrizionale basale quali TBP, TAF_{II}32, TAF_{II}70, TFIID and P-TEFb (7) e pertanto potrebbe influenzare l'assemblaggio e il funzionamento del complesso di pre-inizio. Esso infine promuove il rimodellamento della regione promotrice reclutando la proteina CBP, la quale lega l'enzima CREB che ha un'attività acetiltrasferasica sulle proteine istoniche (8). Il trans-attivatore di classe II, dunque, attiva la trascrizione dei geni MHC di classe II, non legandosi direttamente al DNA, ma attraverso una serie di interazioni proteina-proteina, a livello della regione promotrice prossimale S-X1-X2-Y.

5. Polimorfismo allelico dei geni MHCII e sindromi autoimmunitarie

I geni MHCII sono altamente polimorfici. Fatta eccezione per DRA, dimorfico, la lista degli alleli di DQA, DQB e DRB1 è in continua crescita (DQA=22, DQB=54, DRA=2, and DRB=409). Studi genetici ed epidemiologici hanno implicato molti di questi alleli nella patogenesi di malattie autoimmunitarie. Specifici alleli di DR e DQ sono legati alla suscettibilità a malattie come l'artrite reumatoide, il diabete mellito di tipo I, la sclerosi multipla e la celiachia (9). Il meccanismo molecolare attraverso il quale questi alleli conferiscono tale suscettibilità non è del tutto chiaro. L'ipotesi più accreditata è che il polimorfismo, agendo sulla composizione aminoacidica delle molecole MHCII, ne influenza l'affinità e la specificità di binding per i peptidi antigenici. Più precisamente, la capacità di legare i peptidi antigenici, risiede nella tasca di legame formata dai segmenti $\alpha 1$ e $\beta 1$. Il peptide è legato specificamente all'interno della tasca attraverso interazioni con residui aminoacidici a livello dei "pockets" (p) 1, 4, 6 e 9. Per ciascun allele di classe II, ognuno dei cinque pockets ha affinità per determinati residui, e questo determina l'affinità di binding per un dato antigene (10).

Gli alleli DQA1*05 e DQA1*03 sono associati per il 90% al diabete di tipo 1. Studi strutturali hanno dimostrato che in questi due alleli, a differenza degli altri, il residuo 57 β del pocket 9 è un'alanina piuttosto che un acido aspartico, e questo favorisce il legame con il peptide dell'insulina. Allo stesso modo, la presenza in posizione 30 β di una serina piuttosto che una tirosina nel pocket 6 dell'allele DQA1*05, conferisce a quest'ultimo un'elevata affinità per l' α -gliadina, l'epitopo immunogenico del glutine, e lo rende ad altissimo rischio per la patogenesi della celiachia (9). Questo studio è in accordo con il precedente modello genetico proposto da Nepom et al., il quale attribuisce le complesse interazioni genetiche associate alla suscettibilità al

diabete, alle caratteristiche strutturali delle molecole DQ (11). Il concetto principale di questo modello è che esiste una gerarchia di affinità tra gli alleli MHCII che competono per lo stesso peptide immunogenico. Esistono pochi alleli MHCII che danno suscettibilità a malattie autoimmunitarie ed essi devono competere con gli altri. La suscettibilità si manifesta se gli alleli “ad alto rischio” competendo con gli altri alleli presenti nello stesso individuo, riescono a legare il peptide “diabetogenico”. Alla luce di tutto questo, il livello d’espressione di specifici alleli MHCII potrebbe essere rilevante per sviluppo dell’autoimmunità.

E’ stata dimostrata una diversità delle regioni promotrici dei geni DQ, suggerendo che alleli differenti possono essere trascritti con una diversa efficienza (12, 13). L’analisi di un numero limitato di alleli DQA1 e DQB1 usando costrutti con geni reporter ha mostrato inoltre una marcata differenza nella forza dei promotori tra i diversi alleli (14, 15). Tre diversi studi hanno anche dimostrato una diversa espressione degli alleli DQA1 a livello dell’mRNA nel sangue periferico di individui sani e in soggetti con diabete di tipo 1 (16, 17, 18). Tuttavia la correlazione tra il livello di espressione di specifici alleli DQ e la loro influenza sul rischio di diabete non è semplice. La loro implicazione nella patogenesi delle malattie autoimmunitarie resta ancora da determinare.

II PARTE

REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE

1. Turnover degli mRNAs e controllo traduzionale

La maggior parte degli studi sui meccanismi di controllo dell'espressione genica si è storicamente concentrata sulla regolazione trascrizionale. Tuttavia, la regolazione post-trascrizionale, incluso l'export nucleare, la localizzazione sub-cellulare, il turnover e la traduzione dei messaggeri aggiunge una sostanziale complessità al controllo dell'espressione genica. Il controllo post-trascrizionale è mediato da diverse proteine *RNA-binding* (RBPs) che determinano il destino dei trascritti bersaglio e apparentemente regolano in maniera coordinata gruppi di mRNAs (19, 20). Oltre alle RBPs, anche i siRNAs e i miRNAs possono contribuire al controllo della degradazione e della traduzione dei messaggeri (21).

Un momento importante della regolazione post-trascrizionale è rappresentato dal controllo della stabilità dei trascritti. Agendo sulla stabilità di una molecola di mRNA una cellula può rispondere rapidamente ad uno stimolo esterno e bloccare l'espressione di un particolare prodotto proteico. Gli RNA eucariotici sono caratterizzati dall'aver una considerevole variabilità per quanto concerne la loro vita media, che può andare da pochi minuti a molti giorni. L'emivita dei trascritti è determinata da elementi di controllo localizzati di solito nelle 3'UTR degli mRNAs, riconosciuti da varie RBPs (22). Le sequenze ARE "*AU Rich element*" sono gli elementi di controllo della stabilità meglio caratterizzati. Una caratteristica comune ad alcuni mRNAs altamente instabili è la presenza di una sequenza ricca di AU, composta di circa 50 basi, chiamata ARE, e situata nella regione al 3'UTR. La sequenza consenso degli elementi ARE è AUUUA, e può essere ripetuta varie volte.

Questa sequenza è stata ritrovata in tutti quei geni che devono rispondere velocemente ad uno stimolo esterno, come un ormone o un fattore di crescita. In particolare la ritroviamo nella sequenza 3'UTR dei messaggeri dei protooncogeni *c-fos* e *c-myc*, dei fattori di crescita come *GM-CSF*, *EGF-receptor* (23) e delle citochine come IL-2 e il TNF α (24). La funzione destabilizzante delle ARE è determinata dall'interazione con fattori proteici che legano questi elementi e inducono prima la deadenilazione e poi la degradazione del trascritto.

Sono state identificate numerose proteine ARE-binding, il cui ruolo nella regolazione della stabilità dei trascritti è supportata da osservazioni sperimentali (25, 26). Queste proteine possono promuovere non solo la degradazione dell' mRNA come dimostrato per TTP e BRF1 (27), ma anche aumentarne la stabilità, come nel caso di HuR (28).

Un altro importante momento di controllo post-trascrizionale è rappresentato dalla traduzione. La regolazione della traduzione diventa rilevante in particolari condizioni che richiedono dei cambiamenti netti e rapidi dei livelli della proteina, inclusa la risposta cellulare allo stress e all'apoptosi (29). L'inizio della traduzione è il bersaglio principale della regolazione (30). La regolazione traduzionale globale, che riguarda più trascritti contemporaneamente, avviene attraverso cambiamenti nello stato di fosforilazione dei fattori d'inizio della traduzione o attraverso cambiamenti nel numero di ribosomi disponibili. La regolazione specifica di un trascritto, invece, è mediata da meccanismi diversi. Come per la stabilità, essa coinvolge RBPs che si associano a particolari strutture o elementi di controllo nella 3'UTR dei messaggeri. La 3'UTR, dunque, rappresenta un elemento rilevante nel controllo della traduzione. La stretta correlazione tra controllo traduzionale e poliadenilazione è stata ormai ampiamente dimostrata. Un esempio di tale correlazione è rappresentato dal prodotto

del protooncogene *c-mos*, una proteina essenziale per il proseguimento della meiosi negli oociti di *Xenopus*. In questo caso è stato dimostrato che la traduzione del suo messaggero viene inibita quando l'mRNA non contiene la coda di polyA (31). La 3'UTR può inoltre contenere elementi in grado di attivare o reprimere la traduzione. La proteina p53, un soppressore tumorale che ha un ruolo fondamentale nella risposta cellulare ai danni del DNA, contiene nella regione terminale al 3' una sequenza ricca in U di circa 66 nt che funziona come repressore della traduzione e interagisce con una proteina di 40kDa. In alcuni casi di leucemia mieloide acuta, una patologia che colpisce i progenitori ematopoietici, la proteina è generalmente abbondante e l'mRNA è preferenzialmente associato con i polisomi, indicando un incremento dell'attività traduzionale. In questo caso vi potrebbe essere una mutazione nella sequenza al 3' per cui verrebbe annullata la sua funzione repressiva (32). E' stato dimostrato che la traduzione può essere regolata anche dai miRNAs. I primi microRNA identificati, lin-4 and let-7, agiscono reprimendo la traduzione degli mRNAs target lin-14, lin-28, and lin-41 (33, 34). Più recentemente, è stato dimostrato che miR-17 and miR-20 insieme reprimono la traduzione di E2F1 nelle cellule Hela. In conclusione, la 3' UTR dei messaggeri eucariotici ha un ruolo cruciale nel controllo post-trascrizionale dell'espressione genica. Essa infatti contiene elementi regolatori che controllano molti aspetti della funzionalità dei trascritti: export nucleare, localizzazione citoplasmatica, traducibilità, la stabilità, tasso di degradazione e/o espressione tessuto-specifica.

2. Meccanismi che generano la variabilità della 3'UTR: splicing differenziale e poliadenilazione alternativa

Nei mammiferi più della metà dei geni contengono segnali multipli di splicing e poliadenilazione, dalla cui combinazione possono generarsi varianti dello stesso

trascritto che differiscono per la 3'UTR. Questi trascritti pur codificando la stessa proteina possono avere un metabolismo diverso. Lo splicing è un processo enzimatico che coinvolge un grande complesso formato da *piccoli RNA nucleari* (U1-U6 snRNA) e proteine ad essi associati, chiamato spliceosoma. I segnali di splicing sono principalmente definiti da 3 elementi: 1) il donatore di splicing, caratterizzato da una sequenza invariata GT al 5' dell'introne; 2) l'accettore di splicing, costituito dal dinucleotide AG immediatamente a monte del punto di taglio al 3' dell'introne; 3) il "branch point", una sequenza relativamente conservata '(C/T)T(A/G)A(T/C)' situata 10-40 basi a monte dell'accettore. Il riconoscimento dei siti di splicing alternativi è mediato da proteine appartenenti ad una famiglia di fattori di splicing che legano l'enhancer e i fattori inibitori lungo il pre-mRNA. Alla fine dello splicing, gli introni sono completamente rimossi dal pre-mRNA, e gli esoni sono uniti a formare l'mRNA maturo. Recentemente, la frequenza de geni soggetti a splicing alternativo all'interno della 3'UTR è stata stimata a circa il 35% nell'uomo. Allo stesso modo dello splicing, l'uso di segnali di poliadenilazione alternativi genera diverse isoforme dello stesso trascritto, che differiscono per la lunghezza della 3'UTR. E' stato stimato che più del 50% dei geni dei mammiferi sono soggetti a poliadenilazione alternativa (35). Il processo di formazione della 3' è necessario per promuovere l'export dell'mRNA, per proteggerlo dalla degradazione nucleare e citoplasmatica e incrementarne la traduzione (36). Questo processo include due momenti strettamente accoppiati, durante i quali prima viene tagliato il pre-mRNA in un sito specifico, e poi viene aggiunta la coda di A. Il segnale di poliadenilazione è definito da 3 elementi nei mammiferi: l'esamero AATAAA, situato generalmente 10-30 nucleotidi a monte del sito di taglio; il sito di taglio, costituito dal dinucleotide CA nella maggior parte dei geni; e infine una regione ricca di GT o T, localizzata 30

nucleotidi a valle del sito di taglio. Sono state identificate almeno 14 proteine coinvolte nel “processing” della 3’UTR. Diverse linee di evidenza suggeriscono che la selezione dei siti polyA alternativi è regolata dallo sviluppo ed è un processo tessuto specifico. Ad esempio, alcuni tessuti inclusi la retina e la placenta usano siti di polyA specifici usati poco frequentemente negli altri tessuti (37). Nei neuroni, la prima evidenza che la poliadenilazione genera isoforme di mRNA con diversa localizzazione cellulare è derivata dal gene codificante il “brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Questo trascritto può essere poliadenilato in due siti diversi, producendo due popolazioni di trascritti che differiscono per la lunghezza del 3’UTR. E’ stato recentemente dimostrato che nell’ippocampo il trascritto con la 3’UTR lunga è specificamente localizzato nei dendriti, dove regola la morfologia delle spine. Al contrario il trascritto corto è confinato nel soma della cellula (38). Oltre alla localizzazione cellulare, la poliadenilazione alternativa può influenzare la traducibilità del trascritto. E’ riportato che, nelle cellule neurali di topo, la β -actina genera due trascritti con una diversa lunghezza della 3’UTR dovuti all’utilizzo di due differenti siti di poliadenilazione. Sebbene la 3’UTR più lunga è meno espressa, essa conferisce al trascritto una maggiore efficienza di traducibilità (39). Il rimodellamento della 3’UTR rappresenta un modo molto efficiente da parte della cellula di rispondere a uno stimolo. La scoperta che l’attivazione sia dei neuroni che dei linfociti T induce la produzione di un numero significativo di trascritti con una 3’UTR più corta suggerisce che in condizioni di riposo, molti trascritti con una 3’UTR lunga possono essere bersaglio di proteine inibitrici o di microRNA che ne mantengono silente lo stato traduzionale (40). E’ stato inoltre dimostrato che linee cellulari tumorali spesso esprimono isoforme di mRNA con una 3’UTR corta, derivanti dall’utilizzo di un sito di poliadenilazione alternativo. Tali isoforme

esibiscono una maggiore stabilità e sono 10 volte più tradotte, in parte a causa della perdita della repressione mediata da miRNA. In più, l'espressione dell'isoforma più corta del trascritto del proto-oncogene IGF2/IMP-1 è associata ad un più alto tasso di trasformazione neoplastica. L'alta incidenza della poliadenilazione alternativa nelle cellule tumorali, con conseguente perdita di importanti elementi regolatori suggerisce un ruolo attivo di essa nell'attivazione oncogenica, in assenza di alterazioni genetiche (41).

III PARTE

REGOLAZIONE POST-TRASCRIZIONALE DEI GENI MHC II

Molti studi sono stati effettuati sulla trascrizione dei geni MHC di classe II, ma si conosce poco sui meccanismi di regolazione post-trascrizionali. Negli ultimi anni, tuttavia, si sono accumulate alcune osservazioni sperimentali dell'esistenza di meccanismi attivi a livello della stabilità e della traduzione dei trascritti, sia in topo che nell'uomo. Un primo studio effettuato sulla stabilità dei messaggeri di classe II (42), aveva dimostrato che la vita media di questi mRNA, misurati in cellule della linea B linfoblastoide, Raji, in seguito al blocco della trascrizione con ActinomicinaD è di circa 8-10 ore. Tuttavia se si utilizzava un inibitore della sintesi proteica, quale la cicloesimmide, la vita media di questi mRNA risultava essere drasticamente diminuita a circa un'ora. Questi dati indicavano l'esistenza di un fattore proteico che determinava una stabilizzazione del messaggero e la cui mancanza ne accelerava la degradazione. Tale tipo di modulazione risultava quindi essere un po' diversa da quella generalmente studiata per alcuni messaggeri instabili, quali quelli caratterizzati dalla presenza nel loro 3'UTR di sequenze ARE, per i quali il blocco della sintesi proteica determina un aumento della stabilità. Il fatto che la sintesi proteica fosse necessaria per la stabilizzazione dei trascritti ha permesso di ipotizzare l'esistenza di un meccanismo di controllo della stabilità associata alla traduzione. Per studiare ulteriormente la relazione tra controllo della stabilità e traduzione dei messaggeri di classe II sono stati fatti degli esperimenti in vitro di misurazione della degradazione dell'mRNA associato ai polisomi, derivati da cellule B trattate con inibitori della sintesi proteica. In particolare si è visto che l' mRNA del gene DRA associato con i polisomi in cellule trattate con cicloesimmide, che

provoca un rallentamento del processo di elongazione e lo “stalling” dei ribosomi sull'mRNA, oppure con puromicina, che causa una dispersione dei polisomi e un accumulo dei monosomi, era più rapidamente degradato che in assenza di inibitori della sintesi proteica. Ciò è possibile in quanto il blocco della sintesi proteica espone il messaggero all'azione di RNasi associate ai ribosomi (43). Un approccio diverso era stato quello di verificare l'esistenza di una proteina o di un complesso che legasse le molecole di mRNA del gene DRA a livello delle sue regioni UTR. Infatti è stata dimostrata l'esistenza di una sequenza di circa 100 nucleotidi nella 3'UTR, che lega una proteina e/o un complesso sia a localizzazione nucleare che citoplasmatica e che protegge l'mRNA dalla digestione con RNasi. Si tratta quindi di complessi che migrano con velocità diverse su un gel non denaturante e che sono probabilmente differenti in una o più costituenti. Tuttavia questa interazione mRNA-proteine non è stata associata ad una particolare funzione ma è ancora in fase di caratterizzazione (44).

OBIETTIVO DELLA TESI

Differenze quantitative nel livello di espressione degli alleli dei geni MHCII possono essere determinanti sia nella normale risposta immunitaria, che nell'insorgenza di patologie autoimmunitarie.

La ricerca alla base di questa tesi di dottorato si propone di indagare sui meccanismi di controllo post-trascrizionali che regolano l'accumulo dell'mRNA degli alleli DQA1 associati a sindromi autoimmuni.

In particolare sarà analizzato il ruolo della 3'UTR nella regolazione post-trascrizionale del messaggero di DQA1*0505, allele associato in più del 90% dei casi alla suscettibilità al diabete mellito di tipo 1 e alla celiachia. La presenza di segnali multipli di splicing e di poliadenilazione nelle 3'UTR dell'mRNA di tale allele genera diverse isoforme del trascritto. L'obiettivo di questo progetto sarà quello di caratterizzare tali isoforme dal punto di vista molecolare e funzionale, allo scopo di stabilire se e come variazioni della 3'UTR influenzano la stabilità e la traducibilità del trascritto DQA1*0505.

MATERIALI E METODI

1. Colture cellulari e reagenti

E' stata utilizzata una linea cellulare B linfoblastoide omozigote per l'allele DQA1*0505 (SWEIG007). Essa è stata cresciuta in terreno RPMI 1640 con 10% FCS (GIBCO) e 1% penicillina/streptomina (SIGMA). L'IFN- γ (Peprotech) è stato usato ad una concentrazione di 1000U/ml. L'actinomicina D (SIGMA) è stato utilizzata a 10 μ g/ml.

2. Analisi citofluorimetrica

Dopo 24h di trattamento con l'IFN- γ , l'espressione in superficie delle molecole MHCII (DQ e DR) è stata determinata mediante analisi citofluorimetrica utilizzando il sistema FACS ARIA cell-sorting e il software DIVA (BD Biosciences). 5×10^5 cellule sono state lavate con PBS contenente 0,5% FCS e sono state incubate per 30 minuti in ghiaccio con gli anticorpi monoclonali indicati, coniugati con fluoresceina isotiocianato (FITC). Gli anticorpi utilizzati sono:

- FITC mouse IgG2a isotype control (BD Biosciences)
- FITC mouse anti-human HLA-DQ (BD Biosciences)
- FITC mouse anti-human HLA-DR (BD Biosciences)

Le quantità di anticorpo utilizzate sono indicati dall'industria produttrice.

Dopo due lavaggi in PBS, le cellule sono state analizzate al FACS.

3. Estrazione dell'RNA

L'estrazione è stata effettuata con il TRI REAGENT (Sigma), una soluzione di guanidina tiocianato e fenolo, che contemporaneamente permette la lisi cellulare, il sequestro della parte organica e l'inibizione delle RNasi. In particolare le cellule vengono risospese in un volume di TRI REAGENT proporzionale al numero di cellule (1 ml di reagente per un numero di cellule da 1 a 10×10^6). Dopo il trattamento con cloroformio e successiva centrifugazione, l'RNA è stato recuperato dalla fase acquosa, fatto precipitare con alcool isopropilico, lavato con etanolo al 75% e quindi seccato; infine è stato risospeso in H₂O.

4. 3'RACE PCR

La 3'UTR dell'allele DQA1*0505 è stata amplificata mediante 3'RACE PCR. A tale scopo, 1µg di RNA totale è stato retrotrascritto utilizzando il kit PowerScript™ Reverse Transcriptase system (Clontech) e il primer anchor(dT) AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)₁₈. Tale primer è costituito da una sequenza di T che si appaiano ai polyA dei trascritti fungendo da innesco per la retro trascrizione e una coda di 25 nucleotidi alla quale si appaierà il primer reverse durante la PCR. Un centesimo del cDNA così ottenuto è stato amplificato mediante PCR utilizzando i seguenti primers:

(1) A5: TGGGCACTGTCTTCATCATC (specifico per l'allele DQA1*0505)

(2) Anchor primer : AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC

Le condizioni di PCR utilizzate sono le seguenti: un ciclo a 94°C per 2 min seguito da 36 cicli di amplificazione (94°C per 30 sec, 58°C per 30 sec e 72°C per 2 min). Alla fine della reazione i campioni sono stati incubati a 72°C per 10 min. I prodotti della PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1%. Tre

frammenti sono stati estratti dal gel, purificati mediante Quiaquick extraction kit (Quiagen) e sequenziati. Sono stati analizzati contro i database EMBL e GenBank e successivamente clonati nel vettore pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen).

5. qRT-PCR

L'analisi quantitativa dei trascritti è stata effettuata mediante qRT-PCR, (Opticon Monitor System, MJ Research). Il cDNA è stato preparato da 1 µg di RNA totale, con una reazione di retrotrascrizione (QuantiTect Reverse Transcription, Quiagen), utilizzando random primers o primers polyA specifici. Un centesimo del cDNA così ottenuto è stato usato come template per ciascuna PCR. Tutte le Real Time PCR sono state realizzate utilizzando QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Quiagen), in presenza di 0.2 µM di primers, in un volume finale di 25 µl. Le condizioni di reazione sono sempre le stesse tranne per la temperatura di annealing, differente a seconda della coppia di primers utilizzata. Esse sono le seguenti: un ciclo a 95°C per 900 sec, seguito da 45 cicli di amplificazione (94°C per 15 sec, 55-60°C per 20 sec e 72°C per 20 sec). Tutte le coppie di primers sono state disegnate in maniera da essere presenti in due esoni diversi separati da almeno un introne, le loro sequenze sono riportate in tabella 1. Ogni campione è stato amplificato in triplicato e ciascun esperimento di PCR contiene due controlli negativi. La presenza del prodotto di PCR è stata confermata come una singola banda del peso molecolare atteso su gel di agarosio. La quantizzazione relativa di mRNA è stata calcolata utilizzando il metodo comparativo del ciclo soglia (Ct, threshold cycle). La normalizzazione è stata fatta basandosi sull'espressione della β-actina. Il valore di espressione di un determinato trascritto viene espresso come $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dove $-\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ del campione sperimentale} - Ct \text{ della } \beta\text{-actina}) - (Ct \text{ del campione di riferimento} - Ct \text{ della } \beta\text{-actina del campione})$

di riferimento). Ct viene definito come il numero di cicli in corrispondenza del quale la quantità di amplificato raggiunge una soglia prefissata. La quantizzazione assoluta, espressa in numero di copie del trascritto, è stata effettuata mediante l'utilizzo di standard specifici. Gli standard consistono nei plasmidi all'interno dei quali sono stati clonate le isoforme. Di questi plasmidi è stato calcolato il numero di copie per un determinato volume (μl) ed effettuato un esperimento di real time PCR con diluizioni seriali che vanno da 1×10^6 copie a 1 copia per campione amplificato. In questo modo si ottiene una curva standard dalla quale, per interpolazione, si ricavano le quantità dei diversi trascritti. Dopo aver calcolato il numero di copie di ciascuna isoforma, il valore ottenuto è stato normalizzato rispetto al valore di espressione del messaggero per la β -actina.

Primers	sequenze 5'-3'
A5	TGGGCACTGTCTTCATCATC
NAR	AGACTTGAAAAACACTGTGACC
F1	TGGGCACTGTCTTCATCATC
DA1F	CATCGCCATCTACAGGAGCA
DA1R	TCCCACAGAAGAGGTGAGAGGA
DA2F	CCTGGAATGGAAGTGTTACCTAC
DA2R	CAGCCCTGGATGAAAGATGG
DA3F	GGAATGGAAGGGCTGACTGAAA
DA3R	CAAGGGTGGGAACACAAGGA
pA1	AAGGGAATTTGTTGCTTCCA
pA2	AACATTTCTGAGCCAAAGGC
pA3	ATCCCAACCATCTCTGTTCATA
pA4	TCCATCAATAACTCTGCAAGGA

Tab.1 Primers utilizzati per la quantizzazione delle isoforme dell'mRNA di DQA1*0505

6. Gradiente di saccarosio

Il gradiente di saccarosio è stato preparato, mediante l'utilizzo di un apposito apparecchio per gradienti, miscelando due soluzioni di saccarosio al 50% e al 15%. Il gradiente è stato conservato a 4° C tutta la notte in maniera tale da creare un gradiente lineare. Le cellule SWEIG007 provenienti da una coltura subconfluente (circa 5×10^6 cellule) sono state lavate con PBS freddo e lisate con 300 μ l di buffer contenente 10mM tris/HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1% DTT, e 1% di Triton X-100. Tutti gli steps sono stati condotti in ghiaccio per inibire l'attività delle RNasi. Le cellule lisate sono state centrifugate a 14000 rpm per 1 minuto a 4°C, al fine di rimuovere i nuclei e i detriti cellulari dall'estratto citoplasmatico contenente i polisomi e l'RNA. Il supernatante è stato trasferito in un nuovo tubo contenente 1 μ l di RNasina (1U/ μ l), 3 μ l di Eparina (30mg/ml), e 3 μ l di PMSF per inibire le RNasi. Gli estratti così preparati sono stati caricati sul gradiente di saccarosio e centrifugati in rotore Beckmann SW41 a 37000 rpm a per 1 ora e 50 min 4°C. Nove frazioni da 1 ml sono state raccolte con un collettore di frazioni in tubi eppendorf contenenti 50 μ l di SDS 20% e 10 μ g di tRNA o RNA di lievito e il profilo di polisomi viene letto allo spettrofotometro a 278 nm. Ciascun campione è stato successivamente digerito con 5 μ l di Proteinasi K (50mg/ml) per 30 min a 37°C. L'RNA contenuto in ogni campione è stato estratto con 300 μ l di fenolo-cloroformio pH 8, precipitato con 2 volumi di Etanolo assoluto, e risospeso in 50 μ l di H₂O. Per verificare l'integrità del gradiente, da ciascun campione di RNA è stata prelevata un'aliquota di 5 μ l, caricata su un gel di agarosio 1.5% e effettuata una corsa elettroforetica a 100V, usando il tampone TAE 1x (40mM Tris, 40mM acetato di sodio, 1mM EDTA).

RISULTATI

1. Polimorfismo della regione 3'UT del trascritto di DQA1*0505

L'analisi della sequenza del DNA genomico corrispondente alla 3' UTR dell'mRNA di DQA1*0505, riportata in letteratura, ha consentito l'identificazione di un unico donatore canonico di splicing AG/GTA, localizzato 20 nucleotidi a valle del codone di stop, e di tre possibili accettori: un accettore canonico (CAG/GT) conservato in tutti gli alleli di DQA1 e localizzato 165 nt a valle del donatore e due accettori non canonici DQA1*0505 specifici (TAA/GT e AG/GGC) localizzati rispettivamente 210 nt e 430 nt dal primo accettore. Sono stati identificati, inoltre, 4 putativi segnali di poliadenilazione DQA1*0505-specifici, rispettivamente 475, 795, 855 e circa 1800 nt a valle del codone di stop (45) (fig.1 A). Il pA2 costituito dall'esamero AATAAA rappresenta il segnale di poliadenilazione canonico. La presenza di questi siti multipli di splicing unita all'esistenza di segnali di poliadenilazione alternativi nella 3'UTR dell'mRNA di DQA1*0505 genera isoforme diverse del trascritto.

2. Analisi dello splicing alternativo nella 3'UTR dell'mRNA di DQA1*0505

La 3'UTR dell'mRNA di DQA1*0505 è stata amplificata mediante 3'RACE PCR. L'RNA totale è stato retrotrascritto utilizzando l'oligonucleotide *anchor d(T)*, un primer costituito da una sequenza di T che si appaia al polyA dei trascritti e una coda di 25 nucleotidi casuali alla quale si appaia l'anchor durante la successiva amplificazione. Il cDNA così ottenuto, infatti, è stato amplificato con la coppia di primers F1/Anchor. Il primer F1 è un primer altamente specifico per DQA1*0505 ed è localizzato nella regione coding, a monte del codone di stop. Sono stati ottenuti ampliconi di diversa lunghezza, corrispondenti alle possibili combinazioni tra splicing e poliadenilazioni (fig.1 B). Tre di essi sono stati sequenziali, caratterizzati e quindi clonati. Derivano dall'utilizzo dei tre differenti accettori di splicing e del

segnale di poliadenilazione pA2. In questo modo è stato caratterizzato il pattern completo di splicing alternativo nella 3'UTR del messaggero di DQA1*0505 (fig. 1 C). Le tre isoforme, denominate DA1/pA2, DA2/pA2 e DA3/pA2 sono state successivamente quantizzate mediante qRT-PCR, utilizzando primers specifici per ciascuna di esse, disegnati a livello delle giunzioni di splicing. Grazie all'utilizzo di standard specifici per ciascuna isoforma è stata possibile una quantizzazione assoluta dei livelli dei trascritti, espressa in numero di copie. Gli standard consistono nei tre plasmidi all'interno dei quali sono state clonate le isoforme. Di questi plasmidi è stato calcolato il numero di copie per un determinato volume (μ l) ed effettuato un esperimento di real time PCR con diluizioni seriali che vanno da 1×10^6 copie a 1 copia per campione amplificato. In questo modo si ottiene una curva standard dalla quale, per interpolazione, si ricavano le quantità dei diversi trascritti. In fig. 3 è riportato il valore dei tre trascritti espressi come percentuale di mRNA rispetto al totale. L'analisi ha rivelato che il 91% del trascritto primario di DQA1*0505 utilizza l'accettore di splicing A1. I siti A2 e A3 sono poco selezionati, rappresentano rispettivamente l'1% e l'8% del trascritto primario.



Fig.1 Struttura della 3'UTR del trascritto di DQA1*0505.

Le sequenze tipiche di splicing sono indicate con la lettera D per il donatore, A1, A2 e A3 per i tre accettori. I quattro segnali di poliadenilazione sono indicati con pA1, pA2, pA3 e pA4. Nella figura sono inoltre indicati i primers utilizzati per la 3'RACE PCR: F1, localizzato nella coding e altamente specifico per DQA1*0505, e Anchor.

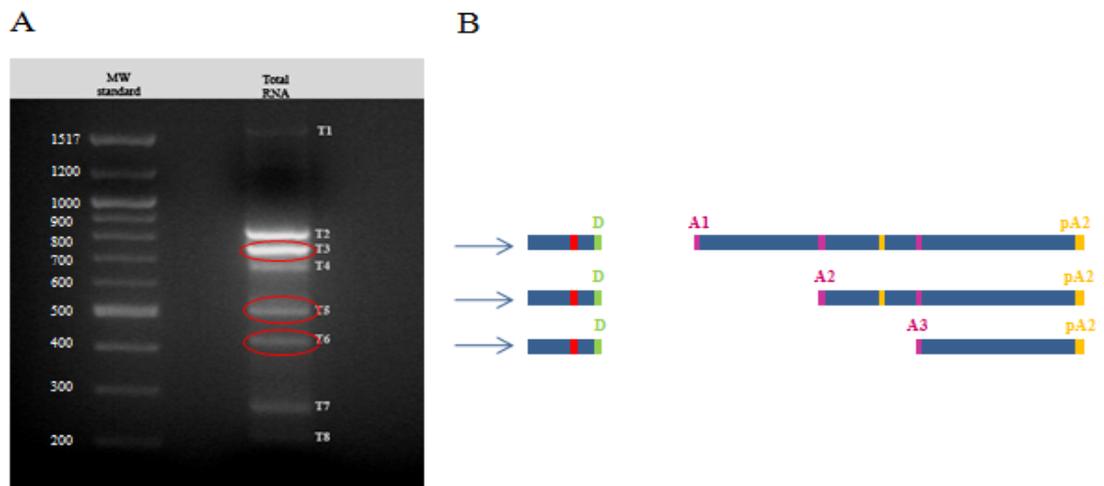


Fig.2 Analisi dello splicing mediante 3'RACE PCR.

(A) Amplificazione della 3'UTR dell'mRNA di DQA1*0505. L'RNA totale, retrotrascritto con il primer anchor (dt), è stato amplificato con la coppia di primers F1/Anchor. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati su gel d'agarosio all'1%. Le bande cerchiare in rosso sono state estratte da gel, purificate e sequenziate. Corrispondono alle tre varianti di splicing alternativo schematicamente rappresentate nel pannello **(B)**. Utilizzano i tre diversi accettori di splicing e il segnale di poliadenilazione pA2.

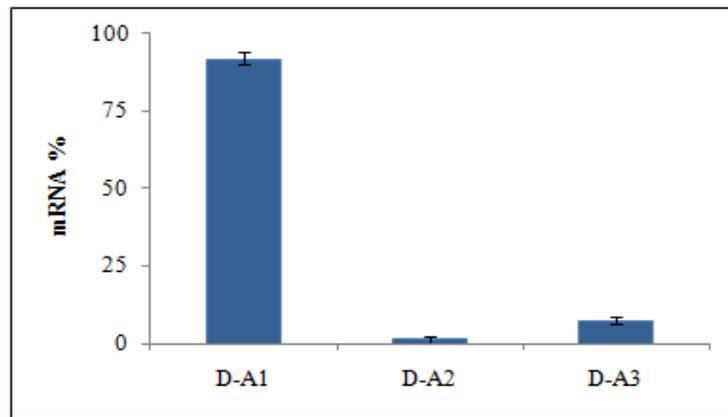


Fig.3 Quantizzazione delle isoforme con splicing alternativo mediante qRT-PCR.

L'RNA totale, retrotrascritto mediante random primers, è stato amplificato con le coppie di primers splicing-specifiche. Il valore di espressione dei trascritti è espresso come percentuale di mRNA. Il dato si riferisce al numero di copie di ciascuna isoforma rispetto al totale. Il numero di copie è stato ricavato interpolando i valori del ciclo soglia (Ct) dei campioni in una curva standard ottenuta dall'amplificazione di diluizioni logaritmiche seriali dei plasmidi contenenti lo stesso prodotto di PCR in esame. Questo dato è rappresentativo di tre esperimenti diversi.

3. Analisi della poliadenilazione alternativa nella 3'UTR dell'mRNA di DQA1*0505

Oltre allo splicing differenziale, la poliadenilazione alternativa contribuisce al polimorfismo della 3'UTR del trascritto DQA1*0505. Il taglio dell'mRNA nei diversi siti di polyA identificati può generare quattro isoforme di diversa lunghezza. Al fine di identificare quali segnali di poliadenilazione vengono selezionati durante il processamento dell'mRNA, l'RNA totale di SWEIG007 è stato retrotrascritto utilizzando primers polyA-specifici. Ciascun cDNA polyA-specifico è stato successivamente amplificato mediante qRT-PCR con una coppia di primers (A5/NAR) disegnati a monte del codone di stop, e quindi comuni a tutte le isoforme di DQA1*0505 (fig.4). Ciascuna isoforma è stata quantizzata mediante un complicato sistema di analisi, utilizzando come standard il plasmide contenente lo stesso prodotto di PCR in esame. Più precisamente, il numero di copie dell'isoforma pA4 è stato determinato direttamente amplificando il cDNA pA4 specifico con la coppia di primers A5/NAR; per quantizzare l'isoforma pA3 invece è stato necessario sottrarre al numero di copie ottenuto dall'amplificazione del cDNA pA3-specifico, il numero di copie di pA4, dal momento che il primer pA3 utilizzato per la retro trascrizione è comune alle due isoforme (fig.4). Allo stesso modo, essendo il primer pA2 contenuto nelle isoforme pA2, pA3 e pA4, per quantizzare l'isoforma con tale polyA bisogna sottrarre al suo numero di copie di pA2, quelle derivanti dall'amplificazione di pA3. Infine, il numero di copie del trascritto pA1 è stato determinato sottraendo al numero di copie ottenuto dall'amplificazione del cDNA pA1-specifico, il numero di copie di pA2. Mediante quest'analisi è stata stimata la frequenza dei quattro trascritti alternativamente poliadenilati. E' stato dimostrato che

sito di poliadenilazione preferenzialmente selezionato è il pA2 (81%), l'unico sito canonico nel trascritto di DQA1*0505.

I trascritti pA1 e pA3 sono poco rappresentati (rispettivamente 9,4% e 3,7%). In più, sorprendentemente, il 5,7% del trascritto primario di DQA1*0505 utilizza pA4 (fig.5). Amplificando mediante PCR il cDNA pA4-specifico, abbiamo confermato l'esistenza di questo segnale di poliadenilazione non convenzionale ma evidentemente funzionale, che genera una 3'UTR di circa 2000nt. Il ruolo di una 3'UTR così lunga non è chiaro, ma sicuramente molto interessante.



Fig.4 Posizione dei primers utilizzati per l'analisi della poliadenilazione alternativa. L'RNA totale di DQA1*0505 è stato retrotrascritto con i primers polyA-specifici (pA1, pA2, pA3 e pA4). I cDNA così ottenuti sono stati amplificati mediante qRT-PCR utilizzando la coppia di primers A5/NAR, localizzata nella regione coding e quindi comune a tutte le isoforme.

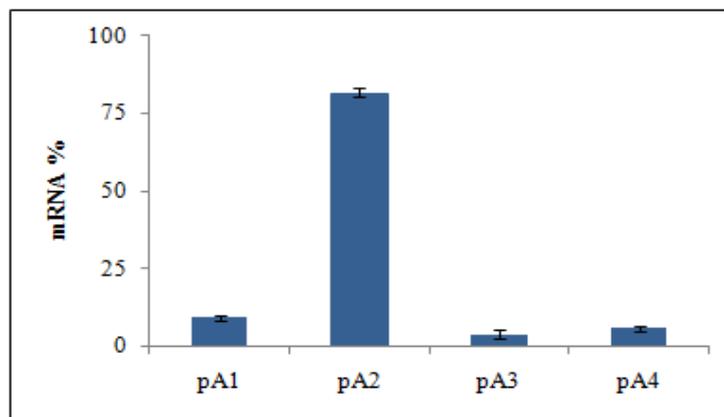


Fig.5 Quantizzazione delle isoforme con poliadenilazione alternativa mediante qRT-PCR. L'RNA totale, retrotrascritto mediante primers polyA-specifici, è stato amplificato con la coppia di primers A5/NAR, comune a tutte le isoforme. Il numero di copie di ciascun trascritto alternativo è stato ottenuto utilizzando come standard diluizioni seriali del plasmide contenente lo stesso prodotto di PCR in esame (A5/NAR). La quantità di ciascuna isoforma è espressa come percentuale rispetto all'mRNA totale. Il dato è rappresentativo di tre esperimenti diversi.

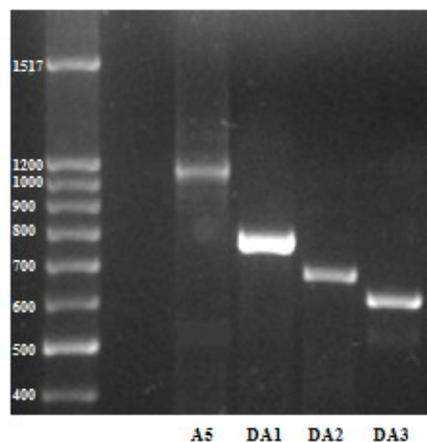


Fig.5 Conferma dell'esistenza del trascritto di DQA1*0505 poliadenilato al pA4. Il cDNA pA4-specifico è stato amplificato mediante PCR utilizzando le coppie di primer A5/pA4, DA1F/pA4, DA2F/pA4, DA3F/pA4. In questo modo è stata confermata l'esistenza degli mRNAs pA4 sia full-length che con splicing alternativo.

4. Combinazione di splicing differenziale e poliadenilazione alternativa nella 3'UTR dell'mRNA di DQA1*0505

Il processamento dell'mRNA di DQA1*0505 genera tre isoforme del trascritto con diversi accettori di splicing e quattro isoforme con polyA alternativi. Per stabilire in che modo splicing e poliadenilazione sono accoppiati, l'RNA totale di SWEIG007 è stato retrotrascritto con primers polyA specifici, e ciascun cDNA così ottenuto è stato amplificato mediante qRT-PCR con le coppie di primers splicing-specifici. In questo modo è stato determinato il pattern di tutte le possibili varianti del messaggero di DQA1*0505 in SWEIG007 (fig.7). L'analisi ha dimostrato che la combinazione di splicing differenziale e poliadenilazione alternativa genera dieci trascritti di DQA1*0505 che differiscono per la lunghezza della 3'UTR. Le isoforme più abbondanti utilizzano l'accettore di splicing A1 e sono poliadenilate ai siti pA1 o pA2.

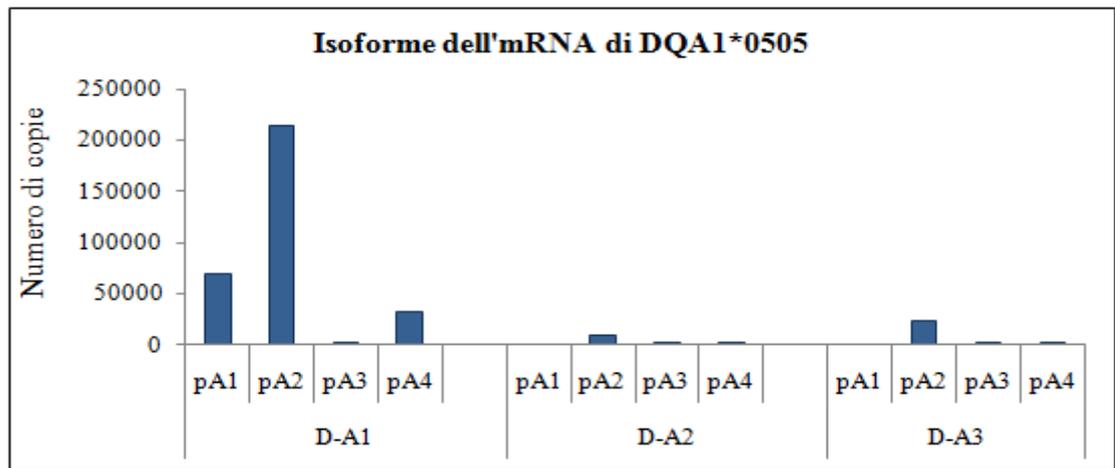


Fig.7 Pattern delle isoforme di DQA1*0505 identificate in SWEIG007. Ciascuna isoforma è stata quantizzata mediante qRT-PCR, amplificando i cDNA polyA-specifici con i primers splicing specifici. Il numero di copie è stato ricavato interpolando i valori del ciclo soglia (Ct) dei campioni in una curva standard ottenuta dall'amplificazione di diluizioni logaritmiche seriali dei plasmidi contenenti rispettivamente le isoforme DA1, DA2 e DA3. Questo dato è rappresentativo di tre esperimenti diversi.

5. Effetto della stimolazione con IFN- γ sul trascritto totale DQA1*0505 e sull'espressione in superficie dell'eterodimero DQ.

In letteratura sono riportati numerosi esempi di geni con segnali multipli di poliadenilazione il cui utilizzo può cambiare in funzione dello stato fisiologico delle cellule o del tessuto in cui essi sono espressi. Al fine di analizzare se il pattern delle isoforme del trascritto DQA1*0505 varia in seguito ad induzione, le cellule sono state stimulate per 24h con 1000U/ml di IFN- γ . E' noto infatti che tale citochina induce un incremento dell'espressione delle molecole MHCII nelle APC professionali e non. L'induzione è stata misurata sia mediante saggio citofluorimetrico per l'espressione in superficie degli eterodimeri DQ e DR, sia mediante qRT-PCR per l'analisi del messaggero totale di DQA1*0505. In figura 8 è mostrato il livello di espressione di DR e DQ, come "intensità di fluorescenza media", prima e dopo stimolazione. L'analisi ha mostrato un dato nuovo e inaspettato: in SWEIG007, un linea cellulare B linfoblastoide, la stimolazione con IFN- γ non induce nessuna variazione dell'espressione in superficie degli eterodimeri DQ e DR, diversamente da quanto avviene in altre cellule presentanti l'antigene. Il saggio di qRT-PCR, d'altra parte, ha mostrato un aumento significativo del trascritto totale DQA1*0505 significativo in seguito a stimolazione (fig.9). Al fine di stabilire se il mancato aumento dell'espressione di DQ è dovuto ad una diminuzione della traduzione dei messaggeri, è stata analizzato il profilo traduzionale dell'mRNA di DQA1*0505. Questo studio è stato effettuato mediante separazione degli estratti citoplasmatici su un gradiente di saccarosio, che consente di frazionare messaggeri in attiva sintesi proteica da messaggeri meno efficientemente tradotti. In seguito ad una blanda lisi cellulare in presenza di cicloesimmide, che blocca i ribosomi nella loro posizione originaria sugli mRNA, gli estratti citoplasmatici vengono su un gradiente

di saccarosio 10%-50%. In seguito a centrifugazione, le varie componenti citoplasmatiche si distribuiscono lungo il gradiente in base alla loro densità, per cui nella parte più alta del gradiente ritroveremo le componenti meno dense e man mano che si scende lungo il gradiente troviamo le componenti citoplasmatiche più dense. Le frazioni vengono raccolte utilizzando un collettore automatico e contemporaneamente analizzate allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 278nm. Nelle nostre condizioni sperimentali le prime frazioni ad essere raccolte sono quelle della parte più bassa del gradiente, vale a dire quelle più dense, ed è qui che ci si aspetta di ritrovare le componenti polisomiali, man mano che si procede alla raccolta delle frazioni si arriva alla componente monosomale ed infine le ultime frazioni raccolte contengono tutta la componente di mRNA libero. In particolare, nelle nostre condizioni sperimentali, le frazioni raccolte sono 9. Le frazioni comprese tra la 1 e la 3 contengono messaggeri associati ai polisomi, quindi in attiva sintesi proteica; le frazioni contenenti i monosomi sono quelle comprese tra la 4 e la 7; nelle frazioni 8 e 9 è contenuto l'mRNA libero, cioè le molecole di messaggero non in fase di attiva traduzione. Dopo purificazione un uguale volume di RNA presente in ciascuna frazione del gradiente è stato utilizzato per la retrotrascrizione e la successiva analisi mediante qRT-PCR. Per controllare la possibile perdita di campione durante la purificazione e per normalizzare l'efficienza di retrotrascrizione, è stata aggiunta ad ogni frazione una quantità nota di un RNA trascritto in vitro, la cui quantizzazione è stata utilizzata nella normalizzazione. Inoltre come controllo dell'efficienza del gradiente è stato analizzato il profilo polisomale della β -actina la cui associazione con i polisomi è ben nota. L'integrità dell'RNA viene anche valutata su un gel di agarosio all'1,5%, mediante conferma delle due bande ribosomiali 18S e 28S. In figura 10 è mostrato il profilo polisomale del messaggero di

DQA1*0505 prima e dopo stimolazione delle cellule con IFN- γ . Sull'asse delle ordinate è riportata la quantità di messaggero, indicato come percentuale rispetto all'mRNA totale presente nel gradiente, sull'asse delle ascisse sono riportate in successione le frazioni raccolte. Nelle cellule non trattate, la maggior parte del trascritto si trova nelle prime tre frazioni, con un picco nella due, indicando che esso è efficacemente tradotto. L'induzione con IFN- γ provoca uno *shift* del picco dalla frazione due alla frazione cinque, e di conseguenza una diminuzione dell'efficienza traduzionale. In sintesi, il trattamento con IFN- γ induce un aumento del messaggero di DQA1*0505 ma una diminuzione della sua traducibilità. Questo spiega il mancato aumento dell'espressione in superficie dell'eterodimero DQ.

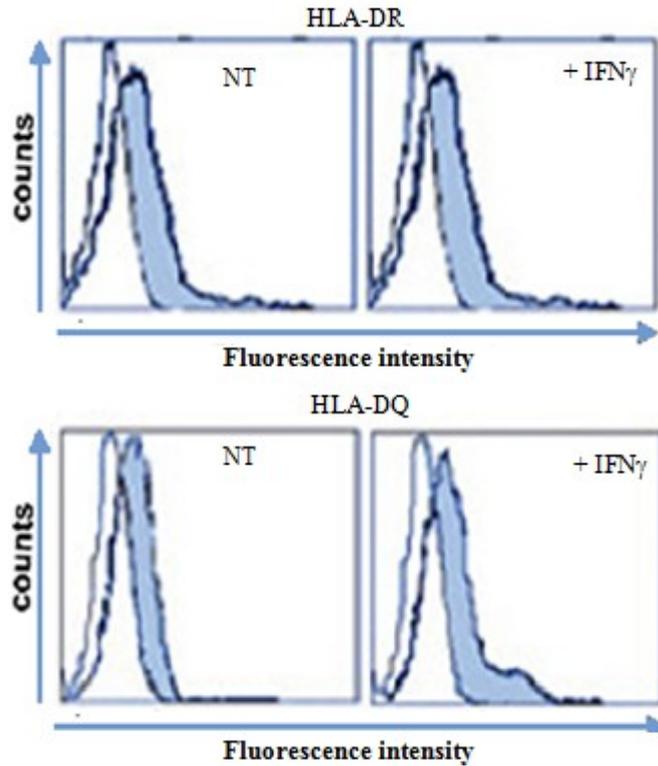


Fig. 8 Analisi citofluorimetrica dell'espressione in superficie degli eterodimeri DR e DQ, in seguito a stimolazione con IFN- γ . Negli istogrammi, l'asse delle x rappresenta l'intensità di fluorescenza, espressa in decadi logaritmiche, l'asse delle y il numero totale degli eventi acquisiti.

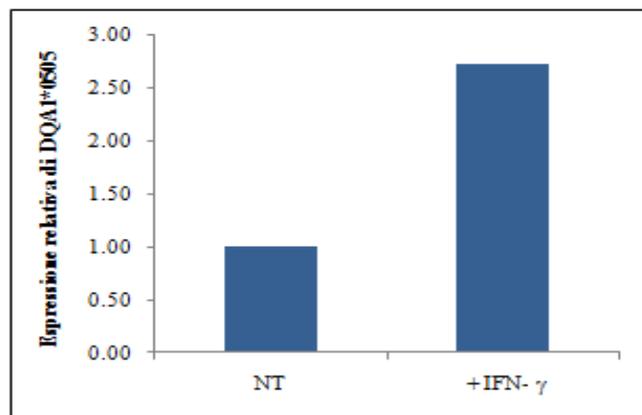


Fig.9 Analisi dell'espressione del messaggero DQA1*0505 in seguito a stimolazione con IFN- γ . Le cellule sono state stimolate per 24h con 1000U/ml di IFN- γ . L'mRNA totale di DQA1*0505 è stato misurato mediante qRT-PCR, utilizzando la coppia di primers A5/NAR, comune a tutte le isoforme. I valori ottenuti sono stati normalizzati rispetto all'espressione della β -actina. In grafico è riportata l'espressione relativa del messaggero. Il valore di espressione delle cellule non trattate viene imposto uguale a 1.

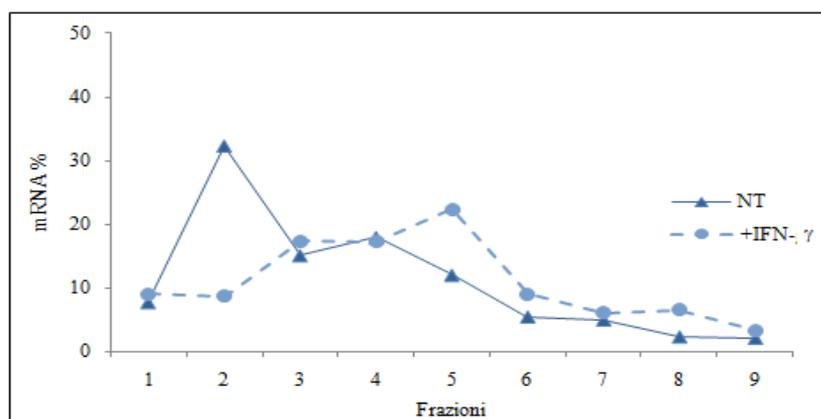


Fig.10 Profilo polisomale del messaggero HLA-DQA1*05. Le cellule sono state trattate per 24h con IFN- γ (1000U/ml), raccolte e l'estratto citoplasmatico delle stesse è stato separato su un gradiente di saccarosio 15-50%. L'RNA specifico contenuto in ogni frazione è stato quantizzato mediante real time PCR e l'espressione del messaggero è stata normalizzata rispetto ad un RNA sintetico aggiunto nella stessa concentrazione ad ogni frazione prima della purificazione. Nel grafico è mostrato il profilo polisomale delle cellule trattate, rispetto al profilo polisomale delle cellule non trattate. Questo risultato è rappresentativo di tre esperimenti differenti.

6. Analisi del pattern delle isoforme del trascritto di DQA1*0505 in seguito a stimolazione con IFN- γ .

Alla luce di questi risultati, sempre mediante qRT-PCR, è stato analizzato l'effetto dell' IFN- γ sul pattern delle isoforme alternative del trascritto. L'analisi ha dimostrato che il pattern dello splicing differenziale non cambia in seguito a stimolazione; le tre isoforme, infatti, sono ugualmente rappresentate in SWEIG0007 prima e dopo trattamento (fig.11A). Il pattern di poliadenilazione alternativa, invece, cambia radicalmente dopo induzione (fig.11B). In particolare, l'isoforma pA2 presente per il 91% in condizioni fisiologiche diminuisce drasticamente fino a scomparire, mentre aumenta notevolmente il trascritto poliadenilato al pA1. Nel complesso in seguito a stimolazione con IFN- γ cambia la distribuzione delle varianti del trascritto di DQA1*05. L'isoforma più abbondante dopo stimolazione è DA1/PA1 (fig.12).

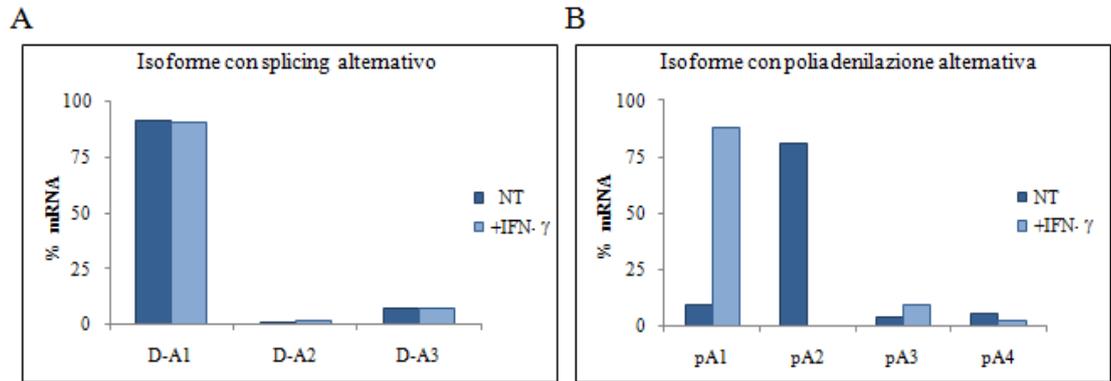


Fig.11 Analisi dell'espressione delle isoforme dell'mRNA DQA1*0505 in seguito a stimolazione con IFN- γ . **(A)** Analisi dello splicing differenziale. Le cellule sono state trattate con 1000U/ml di IFN- γ . Dopo 24h, l'RNA totale, retrotrascritto mediante random primers, è stato amplificato con le coppie di primers splicing-specifiche. La quantità di ciascuna isoforma è espressa come percentuale rispetto all'mRNA totale. **(B)** Analisi della poliadenilazione alternativa. Dopo 24h di stimolazione con IFN- γ , l'RNA totale, retrotrascritto mediante primers polyA specifici, è stato amplificato con la coppia di primers A5/NAR, comune a tutte le isoforme. La quantità di ciascuna isoforma è espressa come percentuale rispetto all'mRNA totale

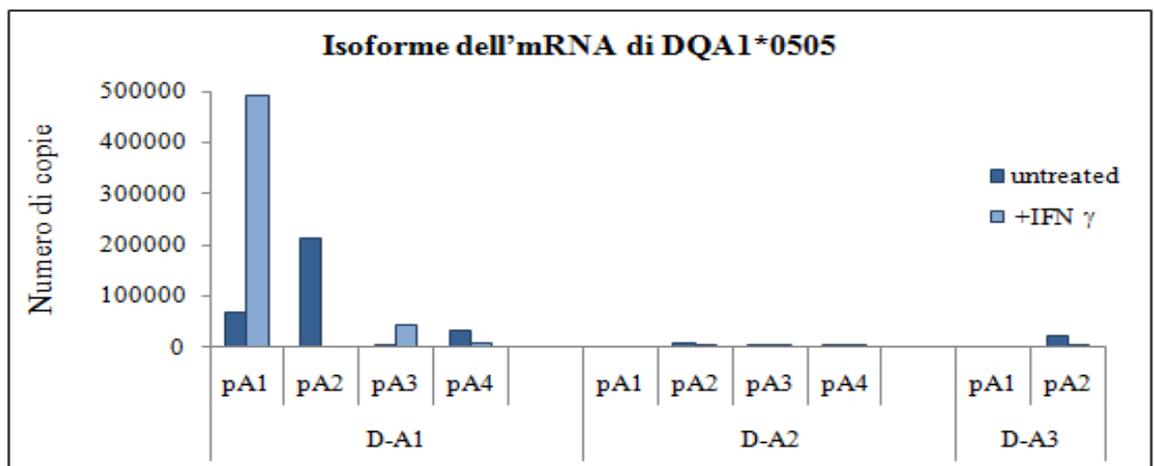


Fig.12 Pattern dei trascritti di DQA1*0505 in seguito ad induzione con IFN- γ . Ciascuna isoforma è stata quantizzata mediante qRT-PCR, amplificando i cDNA polyA-specifici con i primers splicing specifici. In grafico è riportati il numero di copie di ciascuna di esse. Il numero di copie è stato ricavato interpolando i valori del ciclo soglia (Ct) dei campioni in una curva standard ottenuta dall'amplificazione di diluizioni logaritmiche seriali dei plasmidi contenenti rispettivamente le isoforme DA1, DA2 e DA3. Questo dato è rappresentativo di tre esperimenti diversi.

7. Analisi del profilo polisomale delle isoforme di DQA1*0505

Al fine di valutare se splicing differenziale e poliadenilazione alternativa influenzano l'efficienza di traducibilità dei trascritti, è stato analizzato il profilo polisomale delle singole isoforme, mediante gradiente di saccarosio. In figura 13 sono riportati i profili tradizionali delle tre isoforme con splicing alternativo prima e dopo stimolazione con IFN- γ . Anche in questo caso, il profilo di distribuzione polisomale è stato riportato come percentuale di mRNA presente in ciascuna frazione considerando come 100% l'RNA contenuto in tutto il gradiente. I tre trascritti di DQA1*0505 vengono tradotti con la stessa efficienza. Più precisamente, nelle cellule non trattate, le tre isoforme sono principalmente rappresentate nelle frazioni polisomali, e quindi attivamente tradotte. Dopo stimolazione, così come per il trascritto totale, si assiste ad un shift di tutti e tre gli mRNAs nelle frazioni monosomali, indicando una diminuzione della traduzione. Lo splicing, pertanto, non ha alcun effetto sulla traducibilità dei trascritti di DQA1*0505.

Allo stesso modo è stata analizzata l'efficienza traduzionale dei trascritti alternativamente poliadenilati. In figura 14 sono riportati i profili polisomali di tutte le varianti di polyA, prima e dopo stimolazione. A differenza dello splicing differenziale, le isoforme con polyA alternativi si distribuiscono diversamente lungo il gradiente di saccarosio. In particolare, nelle cellule non trattate, le isoforme pA2, pA3 e pA4 hanno un profilo polisomale simile e sono rappresentate nelle frazioni attivamente tradotte; il trascritto più corto pA1, invece, si trova principalmente nelle frazioni monosomali. Dopo stimolazione, mentre le isoforme pA1, pA2 e pA3 si spostano nella frazione monosomale cinque, il trascritto pA1 si sposta completamente nelle frazioni contenenti RNA libero, e quindi completamente non tradotto.

La poliadenilazione, dunque, influenza la traducibilità dei trascritti. In particolare, il trascritto corto con il sito prossimale pA1 non è tradotto.

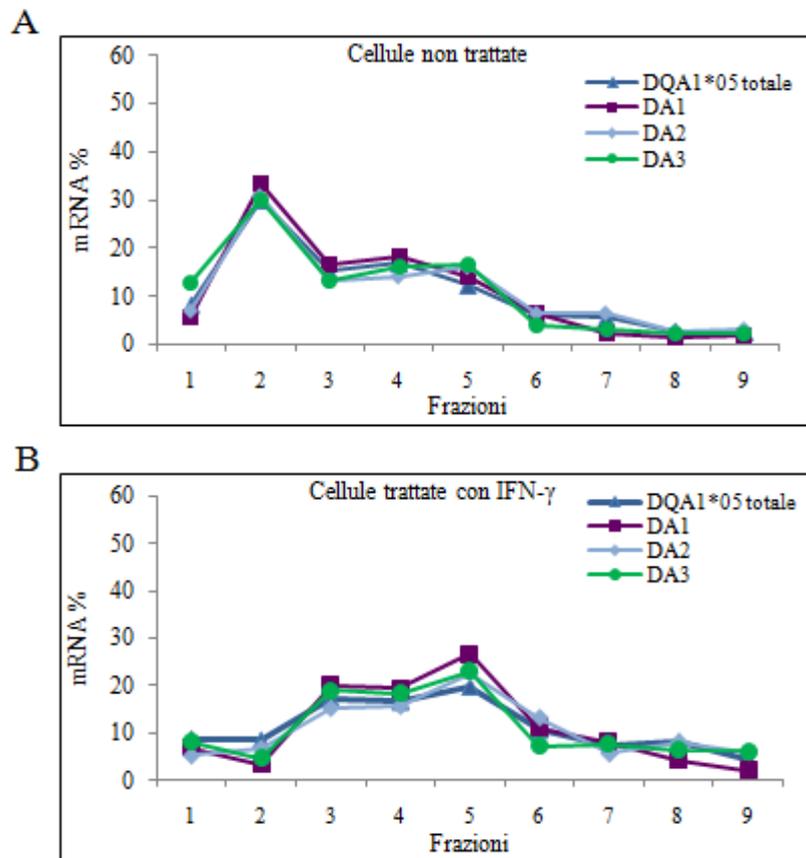


Fig.13 Profilo polisomale delle isoforme dell'mRNA di DQA1*0505 con splicing alternativo, prima (A) e dopo (B) stimolazione con IFN- γ . Gli estratti citoplasmatici delle cellule, trattate e non trattate, sono stati separato su un gradiente di saccarosio 15-50%. L'RNA contenuto in ogni frazione è stato quantizzato mediante real time PCR, utilizzando le coppie di primers splicing-specifiche, e l'espressione del messaggero è stata normalizzata rispetto ad un RNA sintetico aggiunto nella stessa concentrazione ad ogni frazione prima della purificazione.

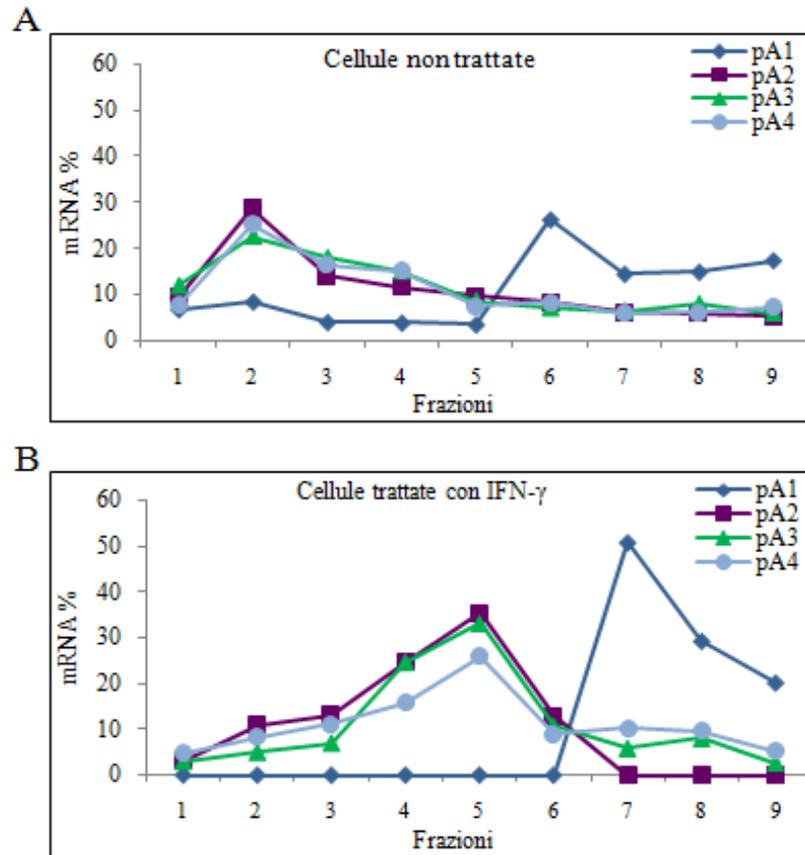


Fig.14 Profilo polisomale delle isoforme dell'mRNA di DQA1*0505 con poliadenilazione alternativa, in SWEIG007 non trattate (A) o stimulate con IFN- γ . Gli estratti citoplasmatici delle cellule, trattate e non trattate, è stato separato su un gradiente di saccarosio 15-50%. L'RNA contenuto in ogni frazione è stato retro trascritto con i primers polyA specifici e amplificato mediante qRT-PCR con la coppia di primers A5/NAR. L'espressione del messaggero è stata normalizzata rispetto ad un RNA sintetico aggiunto nella stessa concentrazione ad ogni frazione prima della purificazione.

8. Analisi della stabilità delle isoforme di DQA1*0505

Al fine di caratterizzare dal punto di vista funzionale il polimorfismo della 3'UTR del messaggero DQA1*0505, è stata analizzata l'influenza che esso ha sulla stabilità dei trascritti. Le cellule sono state trattate con 10µg/ml di Actinomicina D, per bloccare la trascrizione, e l'accumulo di tutte le isoforme è stato misurato in tempi diversi (0h, 2h, 4h e 6h) mediante qRT-PCR. Come mostrato in fig.15 A, le tre isoforme hanno la stessa emivita (5-6h), indicando pertanto che lo splicing alternativo non influenza la stabilità dei trascritti DQA1*0505. Allo stesso modo, sono state valutate le differenze in stabilità dei messaggeri alternativamente poliadenilati. La fig.15 B mostra che l'isoforma più corta, che utilizza il sito prossimale di poliadenilazione pA1, è molto più instabile delle altre, con un'emivita di circa 3 ore. A differenza dello splicing, pertanto, l'utilizzo di segnali diversi di poliadenilazione modula la stabilità dei messaggeri.

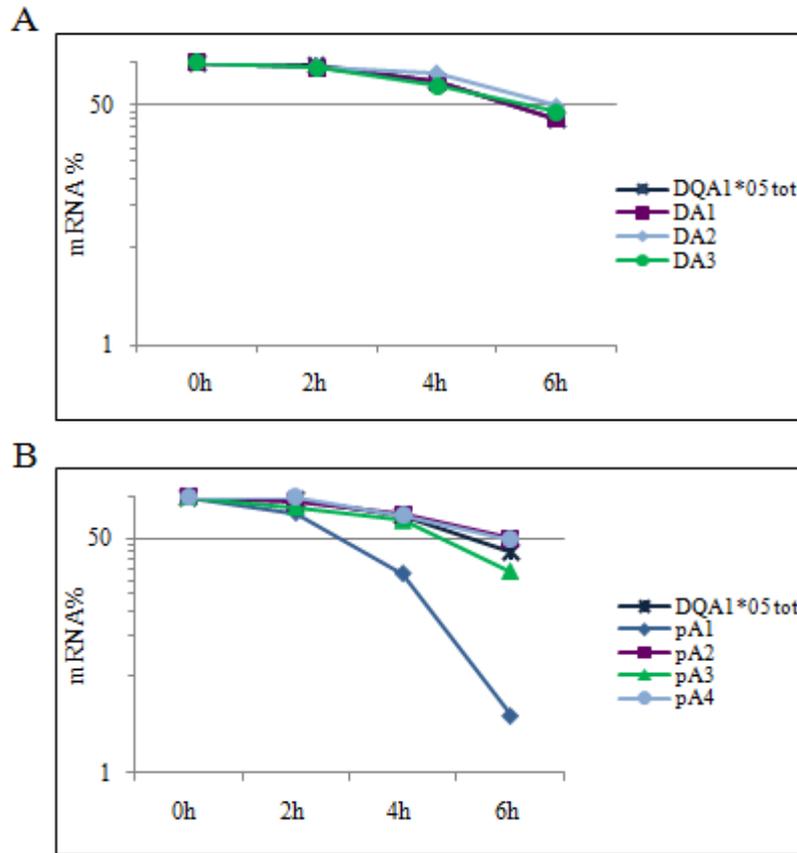


Fig.13. Analisi della stabilità delle isoforme di DQA1*0505. Il tasso di decadimento, espresso come percentuale di mRNA, è stato misurato mediante qRT-PCR a 0h, 2h, 4h e 6h dal trattamento con actinomicina D. **A.** Effetto dello splicing alternativo sull'emivita dei trascritti. **B.** Effetto delle poliadenilazione alternativa sull'emivita dei trascritti.

DISCUSSIONE

Gli antigeni d'istocompatibilità di classe II hanno un'importante funzione immunologica; essi, infatti, legano i peptidi antigenici e li presentano ai linfociti T helper, attivando la risposta immunitaria. L'intensità di tale risposta è correlata alla densità di queste molecole sulla superficie delle APCs.

L'espressione dei geni MHCII è regolata principalmente e in maniera coordinata a livello trascrizionale, grazie ad una serie di elementi di controllo altamente conservati, localizzati nelle regioni regolatrici dei loro promotori. Diversità nelle sequenze di tali elementi e le conseguenti differenze nella forza dei promotori giustificano la dissociazione interlocus ed intralocus (allelica) osservata per alcuni di questi geni (46). In particolare, variazioni quantitative dell'espressione degli alleli di classe II potrebbero determinare la co-segregazione di alcune malattie autoimmunitarie organo-specifiche con i geni MHCII attraverso diversi meccanismi. In primo luogo, l'over-espressione di una particolare molecola MHCII localizzata in un organo bersaglio potrebbe iniziare o perpetuare il processo di auto-distruzione; in secondo luogo, l'espressione di una particolare molecola MHCII in certe APCs potrebbe attivare specifiche sottopopolazioni di linfociti T CD4⁺; infine, la presenza di determinate molecole MHCII durante il processo di selezione timica delle cellule T, potrebbe causare la selezione positiva delle cellule T autoreattive. I geni DQ, ad esempio, mostrano una forte associazione con la suscettibilità al diabete mellito di tipo 1. Variazioni nell'espressione dei geni DQA1 o DQB1 in individui eterozigoti potrebbero alterare la stechiometria degli eterodimeri $\alpha\beta$ e consentire l'espressione preferenziale di un particolare eterodimero sulla superficie cellulare, conferendo un fenotipo "diabetogenico". L'esempio successivo è davvero chiarificatore. Qualche anno fa, il nostro gruppo, studiando l'effetto dell'IFN- α sull'espressione dei geni MHCII nelle isolette pancreatiche, osservò una diminuzione allele-specifica dei

trascritti di DQA1. In un caso in particolare tale diminuzione era molto significativa: in un individuo genotipicamente eterozigote (DQA1*03/DQA1*01) l'allele DQA1*01 scompariva del tutto in seguito a stimolazione: l'individuo diventava fenotipicamente omozigote. Questo assume maggiore rilevanza considerando che l'allele *03 è associato alla suscettibilità al diabete mellito di tipo I, mentre l'allele *01 è considerato protettivo contro la stessa patologia. In pratica l'individuo diventava potenzialmente diabetico. Questo esempio dimostra come differenze quantitative nel livello di espressione degli alleli MHCII possano essere determinanti sia nella normale risposta immunitaria, che nell'insorgenza di sindromi autoimmunitarie. La diversità delle regioni promotrici dei geni DQ è stata ampiamente studiata, e ha dimostrato che alleli differenti possono essere trascritti con una diversa efficienza (13, 14). L'analisi di un numero limitato di alleli DQA1 e DQB1 usando costrutti con geni reporter ha mostrato inoltre una marcata differenza nella forza dei promotori tra i diversi alleli (15, 16). Potrebbe essere rilevante analizzare se oltre alla regolazione trascrizionale, esiste un ulteriore livello di controllo dell'accumulo dell'mRNA allele-specifico dei geni DQ.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di investigare sui meccanismi di regolazione post-trascrizionale degli alleli di DQA1 associati a sindromi autoimmuni.

Variazioni all'interno della regione 3'UTR dei trascritti potrebbero essere un importante meccanismo di regolazione dell'espressione genica. Questa regione, infatti, contiene motivi capaci di regolare molti aspetti della funzionalità dei trascritti: l'export nucleare, la localizzazione citoplasmatica, la traducibilità, la stabilità e/o l'espressione tessuto-specifica. *La variabilità della 3'UTR è determinata da splicing differenziali e/o poliadenilazioni alternative.* Lo scopo di questo lavoro è

stato quello di caratterizzare le isoforme allele-specifiche dell'mRNA del gene DQA1 generate dalla combinazione di splicing e poliadenilazione, al fine di identificare un possibile link tra i meccanismi di regolazione post-trascrizionale degli alleli di DQA1 e il loro ruolo nell'insorgenza di sindromi autoimmunitarie.

In particolare, è stato analizzato il polimorfismo della 3'UTR dell'allele DQA1*0505, per tre importanti motivi: 1) a differenza degli altri alleli di DQA1, esso non presenta variabilità nella regione del promotore e questo consente di focalizzarsi esclusivamente su quello che accade a livello post-trascrizionale; 2) come detto in precedenza è associato alla suscettibilità a diverse malattie autoimmuni, in particolare al diabete e alla celiachia; 3) esistono evidenze in letteratura e in studi precedenti condotti dal nostro gruppo, del polimorfismo della 3'UTR di questo allele. L'analisi è stata condotta in una linea cellulare B-linfoblastoide omozigote per l'allele DQA1*0505, un tipo cellulare che esprime costitutivamente alti livelli di molecole MHCII, ed è inoltre inducibile con IFN- γ .

In questa tesi è stato dimostrato che splicing differenziale e poliadenilazione alternativa contribuiscono al polimorfismo della 3'UTR dell'mRNA di DQA1*0505, generando isoforme multiple del trascritto che differiscono per la lunghezza della 3'UTR. Le sequenze tipiche dello splicing sono state osservate tra il codone di stop ed il primo segnale di poliadenilazione. Esse consistono in un donatore canonico, conservato in tutti gli alleli di DQA1, e tre accettori (A1, A2, A3) allele-specifici che competono tra di loro. Il sito A1 rappresenta l'unico accettore canonico. Per quanto riguarda la poliadenilazione sono stati identificati quattro diversi segnali nella 3'UTR del trascritto DQA1*0505, denominati pA1, pA2, pA3 e pA4 (45). Attraverso 3'RACE PCR sono state identificate e caratterizzate le tre isoforme di DQA1*0505 con splicing alternativo. La successiva quantizzazione mediante qRT-PCR ha

mostrato che le tre isoforme sono diversamente rappresentate. Il 91% del trascritto primario di DQA1*0505 utilizza il sito A1 come accettore di splicing. I siti A2 e A3 sono poco selezionati, rappresentano rispettivamente l'1% e l'8% del trascritto primario.

Dalla poliadenilazione alternativa derivano altre quattro isoforme del trascritto di DQA1*0505, anch'esse differientemente rappresentate. Il sito di poliadenilazione preferenzialmente selezionato è il pA2 (81%), l'unico sito canonico del trascritto. I siti PA1 e PA3 sono poco selezionati. In più, sorprendentemente, il 5,7% del trascritto di DQA1 utilizza pA4, localizzato 1800 nt a valle del codone di stop. L'esistenza di questo segnale di polyA non convenzionale, ma evidentemente funzionale, è stato confermato anche mediante PCR. Il suo utilizzo genera una 3'UTR di circa 2000 nt il cui ruolo non è chiaro, ma sicuramente molto interessante.

*La combinazione di splicing differenziale e poliadenilazione alternativa genera ben 10 differenti isoforme del trascritto DQA1*0505 in SWEIG007.*

In letteratura esistono numerosi geni con segnali multipli di poliadenilazione il cui utilizzo può cambiare in funzione dello stato fisiologico delle cellule o del tessuto in cui essi sono espressi (47). E' riportato, ad esempio, che la stimolazione con LPS nei macrofagi murini cambia la poliadenilazione dei trascritti di molti geni, favorendo in particolare la selezione del sito prossimale pA1 (48).

Alla luce di questo, stabilito il pattern delle isoforme dell'mRNA DQA1*0505, si è pensato di analizzare se esso varia in seguito ad induzione. In particolare, *è stato analizzato il profilo delle isoforme DQA1*0505 dopo stimolazione con IFN- γ , una citochina che notoriamente modula la trascrizione delle molecole MHCII, incrementandola nelle APCs professionali o inducendola ex-novo in quelle non*

professionali. L'induzione da parte dell'IFN- γ è stata misurata sia mediante saggio citofluorimetrico, per l'espressione in superficie degli eterodimeri DQ e DR, sia mediante RT-PCR per l'analisi del messaggero totale di DQA1*0505. L'analisi citofluorimetrica, ha mostrato un dato nuovo e inaspettato: in SWEIG007, la stimolazione con IFN- γ , non induce un aumento dell'espressione in superficie delle molecole DQ e DR, diversamente da quanto avviene in altre APC, quali le cellule dendritiche. Il saggio di RT-PCR, d'altra parte, ha mostrato un aumento significativo del messaggero totale DQA1*0505 dopo 24h di stimolazione. Al fine di stabilire se il mancato aumento dell'eterodimero in superficie sia dovuto ad un cambiamento della traducibilità del messaggero, è stato analizzato il profilo polisomale dell'mRNA totale di DQA1*0505. L'analisi, mediante gradiente di saccarosio, ha dimostrato che effettivamente in seguito a stimolazione con IFN- γ , si ha una diminuzione del tasso di traducibilità del trascritto.

Alla luce di questi risultati, è stato analizzato l'effetto dell'IFN- γ sul pattern delle isoforme di DQA1*0505. Relativamente allo splicing, l'analisi di qRT-PCR ha mostrato che le tre isoforme sono ugualmente rappresentate in SWEIG007 sia prima che dopo trattamento. Il pattern di poliadenilazione, invece, cambia radicalmente in seguito a stimolazione: l'isoforma pA2 (presente per l'81% in condizioni fisiologiche) diminuisce drasticamente fino a scomparire, mentre aumenta notevolmente il trascritto pA1 (87%).

*La stimolazione causa un cambiamento nella distribuzione dei messaggeri DQA1*0505, producendo, in particolare, un aumento dell'isoforma più corta, poliadenilata al sito prossimale pA1.*

Al fine di caratterizzare dal punto di vista funzionale questa isoforma, e più in generale per chiarire il significato biologico delle isoforme dell'mRNA di DQA1*0505, è stato analizzato l'effetto di splicing e/o poliadenilazione sulla traducibilità dei trascritti. L'analisi del profilo polisomale ha mostrato che lo splicing differenziale non influenza la traducibilità delle isoforme DQA1*0505. Esse infatti mostrano lo stesso profilo traduzionale sia nelle cellule non trattate che in quelle stimulate. Nelle cellule non trattate sono principalmente rappresentate nelle frazioni polisomiali e quindi sono tradotte. Dopo stimolazione, il tasso di traduzione diminuisce per tutte allo stesso modo. Le isoforme derivanti invece dall'uso dei polyA alternativi si distribuiscono diversamente lungo il gradiente. In particolare, nelle cellule non trattate, le isoforme pA2, pA3 e pA4 hanno un profilo polisomale simile e sono attivamente tradotte; il trascritto più corto pA1, invece, trovandosi principalmente nelle frazioni monosomiali, ha una minore efficienza di traduzione. Dopo stimolazione, mentre le isoforme pA1, pA2 e pA3 si spostano nelle frazioni monosomiali, il trascritto pA1 si sposta completamente nelle frazioni contenenti RNA libero, e quindi non è tradotto. La poliadenilazione, dunque, influenza la traducibilità dei trascritti. In particolare, l'utilizzo del sito pA1 genera un trascritto corto con una scarsa efficienza traduzionale. Se si considera che l'isoforma pA1 è quella che aumenta dopo stimolazione, questo spiegherebbe il mancato aumento dell'espressione in superficie dell'eterodimero DQ in SWEIG007, dopo induzione con IFN- γ .

E' stato inoltre studiato l'effetto di splicing e poliadenilazione sulla stabilità dei trascritti, mediante trattamento delle cellule con Actinomicina D. La misurazione della quantità di messaggeri nel tempo, in seguito al blocco della trascrizione ha permesso la misura della vita media delle diverse isoforme. Le tre isoforme derivanti

dallo splicing alternativo hanno la stessa emivita (circa 5-6 ore), indicando che lo splicing non influenza la stabilità dei trascritti. Diversamente accade per le isoforme derivanti da poliadenilazione alternativa, in cui abbiamo osservato che il trascritto corto pA1 è più instabile e ha un'emivita di circa 3 ore

*Riassumendo, il processamento primario del trascritto DQA1*0505 genera 10 isoforme, derivanti dalla combinazione di splicing e poliadenilazione, con diversa stabilità e traducibilità. In particolare la selezione del sito prossimale pA1 genera un trascritto corto meno stabile e con scarsa efficienza traduzionale.*

Il meccanismo attraverso il quale la poliadenilazione influenza la stabilità e la traduzione dei trascritti di DQA1*0505 non è ancora chiaro. In generale, l'accorciamento della 3'UTR può causare la perdita di elementi regolatori importanti, come ad esempio le sequenze di stabilità, e di conseguenza influenzare la funzione e il destino metabolico degli mRNAs. L'instabilità del trascritto pA1 rispetto alle altre isoforme potrebbe essere spiegata con l'assenza in esso di una sequenza primaria o di una struttura secondaria in grado di evitare la degradazione del messaggero grazie all'interazione con fattori proteici. L'analisi della sequenza della 3'UTR del messaggero DQA1*0505 ha consentito di identificare ben cinque sequenze ARE in questa regione, di cui solo una si trova prima del sito pA1, mentre le altre quattro sono localizzate tra pA1 e pA2. Possiamo quindi ipotizzare che queste sequenze leghino proteine stabilizzanti, e pertanto il trascritto pA1, essendone privo risulta poco stabile.

Conclusioni

*Differenze quantitative nell'espressione degli alleli del gene DQA1 possono essere determinanti per l'insorgenza di gravi patologie autoimmunitarie. In questa tesi è stato dimostrato che i meccanismi di regolazione post-trascrizionale rappresentano un ulteriore livello di controllo nell'accumulo dell'mRNA allele-specifico del gene DQA1. In particolare, variazioni nella 3'UTR dell'allele DQA1*0505, influenzano il metabolismo del trascritto, modulandone sia la stabilità che la traducibilità.*

BIBLIOGRAFIA

1. Brown, J. H., T. S. Jardetzky, J. C. Gorga, L. J. Stern, R. G. Urban, J. L. Strominger and D. C. Wiley. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993 **364**:33-39
2. M. Krawczyk and W. Reith Regulation of MHC class II expression, a unique regulatory system identified by the study of a primary immunodeficiency disease. *Tissue Antigens* 2006 **67**: 183-197.
3. Waldburger, J.M., K. Masternak, A. Muhlethaler-Mottet, J. Villard, M. Peretti, S. Landmann, and W. Reith. Lessons from the bare lymphocyte syndrome: molecular mechanisms regulating MHC II expression. *Immunol Rev* 2000 **178**:148-165
4. Reith W, Leibundgut-Landmann S, Waldburger JM. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol* 2005 **5**: 793–806.
5. Masternak K, Muhlethaler-Mottet A, Villard J, Zufferey M, Steimle V, Reith W. CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex. *Genes Dev* 2000 **14**: 1156–66.
6. Desandro AM, Nagarajan UM, Boss JM. Associations and interactions between bare lymphocyte syndrome factors. *Mol Cell Biol* 2000 **20**: 6587–99.
7. Kanazawa S, Okamoto T, Peterlin BM. Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection. *Immunity* 2000 **12**: 61–70
8. Fontes JD, Kanazawa S, Jean D, Peterlin BM. Interactions between the class II transactivator and CREB binding protein increase transcription of major histocompatibility complex class II genes. *Mol Cell Biol* 1999 **19**: 941–7.
9. Jones EY, Fugger L, Strominger JL, Siebold C MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nat Rev Immunol* 2006 **6**:271–282.

10. Rammensee H-G, Friede T, Stevanović S MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 1995 **41**:178–228.
11. Nepom GT. MHC CLASS-II molecules and autoimmunity. *Ann rev Immunol* 1991 **9**:493-525.
12. Wroblewska E M, Harwood J I, Smith J R and Kagnoff M F. Structure and evolution of the promoter regions of the DQA genes. *Immunogenetics* 1993 **37**: 364-372.
13. Reichstetter S, Krellner P H, Meenzen C M, Kalden J R. and Wassmuth R. Comparative analysis of sequence variability in the upstream regulatory region of the HLA-DQB1 gene. *Immunogenetics* 1994 **39**:207-212
14. Morzycka-Wroblewska E, Ostermayer A M M, Harwood J I, Kagnoff M F. Differential expression of HLA-DQA1 alleles associated with promoter polymorphism. *Immunogenetics* 1997 **45**: 163–170
15. Beaty JS, West KA and Nepom GT. Functional effects of a natural polymorphism in the transcriptional regulatory sequence of HLA-DQB1. *Mol. Cell. Biol.* 1995 **15**:4771-4782
16. Donner H, Seid C, Rau H, Herwig J, Seifried E, Usadel K H and Badenhoop K. Unbalanced amounts of HLA-DQA1 allele mRNA: DQA1*03 shows high and DQA1*0501 low amounts of mRNA in heterozygous individuals. *European Journal of Immunogenetics* 2002 **29**:321-33
17. Fernandez S, Wassmuth R, Knerr I, Frank C and Haas J P. Relative quantification of HLA-DRA1 and -DQA1 expression by real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT–PCR). *European Journal of Immunogenetics*, 2003 **30**:141-148
18. Maffei A, Harris P E, Reed E F, Del Pozzo G, Ciullo M, Suciú-Foca N, and guardiola J. Differential expression of insulin-dependent diabetes mellitus-associated HLA-DQA1 alleles in vivo. *Eur. J. Immunol.* 1997 **27**:1549-1556.
19. Keene J D, Tenenbaum S. Eukaryotic mRNPs May Represent Posttranscriptional Operons. *Molecular Cell* **9**:1161-1167

20. Keene J D and Lager P J. Post-transcriptional operons and regulons coordinating gene expression. *Chromosome Research* 2005 **13**:327-337
21. Tomari Y and Zamore P D. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* 2005 **19**: 517-529
22. Wilusz C J, Wormington M and Peltz S W. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2001 **2**:237–246.
23. Balmer L A, Beveridge D J, Jazayeri J A, Thomson A M, Walker C E, and Leedman P J. Identification of a Novel AU-Rich Element in the 3' Untranslated Region of Epidermal Growth Factor Receptor mRNA That Is the Target for Regulated RNA-Binding Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 2001 **21**:2070-2084.
24. Dean JLE, R Wait, Mahtani K R, Sully G, A R Clark, and Je Saklatvala. The 3' Untranslated Region of Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA Is a Target of the mRNA-Stabilizing Factor HuR. *Molecular and Cellular Biology* 2001 **21**:721-730.
25. Jing Q, Huang S, S Guth, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, Di Padova F, Lin S C, Gram H and Han J. Involvement of MicroRNA in AU-Rich Element-Mediated mRNA Instability. *Cell* 2005 **120**:623-634
26. Fan X C and Steitz J A. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs, *EMBO J.* 1998 **17**:3448–3460
27. Stoecklin G, Colombi M, Raineri I, Leuenberger S, Mallaun M, Schmidlin M, Gross B, Lu M, Kitamura T and Moroni C. Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover, *EMBO J.* 2002 **21**:4709–4718.
28. Peng S S, Chen C Y, Xu N and Shyu A B. RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J.* 1998 **17**:3461–3470.
29. Holcik M and Sonenberg N. Translational control in stress and apoptosis. *Nature Reviews.* 2005 **6**:318-327.

30. Preiss T and Hentze M W. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *BioEssays* 2003 **25**:1201–1211
31. Sheets M D, Wu M and Wickens M. Polyadenylation of c-mos RNA as a control point in *Xenopus* meiotic maturation. *Nature* 1995 **374**: 511-516.
32. Conne B, Stutz A and Vassalli J D. The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nature Medicine* 2000 **6**:637-641.
33. Olsen P H and Ambros V. The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Developmental Biology* **216**:671-680.
34. K Seggerson, L Tang and E.G Moss, Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene lin-28 after translation initiation, *Dev. Biol.* 2002 **243**:215–225.
35. Tian B, Hu J, Zhang H and Lutz C S. A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes *Nucleic Acids Research* 2005 **33**:201-212
36. Moore M J and Proudfoot N J Pre-mRNA Processing Reaches Back to Transcription and Ahead to Translation *Cell* 2009 **136**:688-700
37. Zhang H, Lee J Y and Tian B Biased alternative polyadenylation in human tissues. *Genome Biology* 2005 **6**:R100
38. J J An, K Gharami, G Y Liao, N H Woo, A G Lau, F Vanevski, E R Torre, K R Jones, Y Feng, B Lu, and B Xu. Distinct Role of Long 30 UTR BDNF mRNA in Spine Morphology and Synaptic Plasticity in Hippocampal Neurons. *Cell* 2008 **134**:175-187
39. Ghosh T, Soni K, Scaria V, Halimani M, Bhattacharjee C, Pillai B. MicroRNA-mediated up-regulation of an alternatively polyadenylated variant of the mouse cytoplasmic β -actin gene. *Nucleic Acids Res* 2008 **36**: 6318– 6332

40. To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. Andreassi C, and A Riccio *Trends in Cell Biology* 2009 **19**:465-474.
41. C Mayr and D P. Bartel Widespread Shortening of 3'UTRs by Alternative Cleavage and Polyadenylation Activates Oncogenes in Cancer Cells. *Cell* 2009 **138**:673-684.
42. Maffei A, Perfetto C, Ombra N, Delo Pozzo G and Guardiola J. Transcriptional and post-transcriptional regulation of human MHC class II genes require the synthesis of short-lived proteins. *J. Immunology* 1989 **142**: 3657-3661
43. Del Pozzo G and Guardiola J. The regulation mechanism of HLA class II gene expression at level of mRNA stability. *Immunogenetics* 1996 **44**:453-458.
44. Del Pozzo G, Ciullo M, Autiero M and Guardiola J. Control of nucleocytoplasmic HLA-DRA mRNA partitioning by interaction of a retention signal with compartmentalized proteins *J. mol. Biol.* 1994 **240**:193-204
45. Hoarau J, Cesari M, Caillens H, Cadet F, Pabion M. HLA DQA1 Genes generate multiple transcripts by alternative splicing and polyadenylation of the 3' untranslated region. *Tissue Antigens* 2004: 63:58-71
46. Sukiennicki T L, Shewey L M and Nepom G T. Locus- and allele-specific DNA-protein interactions in the HLA-DQB1 X box. *Immunol Res* 1993 **12**:317-329.
47. Edwalds-Gilbert G, Veraldi KL and Milcarek C Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Research*, **25**:2547-2561.
48. Shell S A, Hesse C, Morris S M, Milcarek Jr. and C. Elevated Levels of the 64-kDa Cleavage Stimulatory Factor (CstF-64) in Lipopolysaccharide-stimulated Macrophages Influence Gene Expression and Induce Alternative Poly(A) Site Selection *The Journal of Biological Chemistry* 2005 **280**: 39950-39961.

