

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

**Dottorato di Ricerca in Oncologia e Patologia Sperimentale:
progetto N. 2 "Patologia Sperimentale", MED/04**

*Ruolo del recettore P2X₇ nella sopravvivenza e
morte cellulare*

Dott.ssa Maria Giulia Callegari

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Sandro Grilli

Tutore:

Chiar.mo Prof. Francesco Di Virgilio

XIX Ciclo, 2004-2006

INDICE

	Pag.
ABBREVIAZIONI	5
INTRODUZIONE	8
ATP COME MESSAGGERO EXTRACELLULARE	8
Funzioni dell'ATP come messaggero extracellulare.....	9
Modalità di secrezione dell'ATP.....	11
Enzimi regolatori della concentrazione extracellulare diATP.....	12
Tecniche di quantificazione del rilascio di ATP.....	12
I RECETTORI PURINERGICI	13
I recettori P2X.....	14
IL RECETTORE P2X₇	20
Il recettore P2X ₇ : ruolo nella proliferazione e nell'apoptosi.....	25
IONE CALCIO COME SECONDO MESSAGGERO	27
L'omeostasi del calcio all'interno della cellula.....	27
Canali del calcio sulla membrana plasmatica.....	27
Meccanismi di estrusione del calcio.....	28
Depositi di calcio intracellulari.....	29
Sistemi tampone per il calcio.....	30
Ione calcio e proliferazione.....	30
Il calcio e la sintesi di ATP nei mitocondri.....	32
IL RETICOLO ENDOPLASMATICO	34
Struttura submicroscopica e funzioni.....	34
Il reticolo endoplasmico come deposito intracellulare di calcio.....	37
Le calcio ATPasi SERCA.....	39
Distribuzione delle SERCA.....	40
Caratteristiche delle tre differenti isoforme di SERCA.....	40
Inibizione farmacologica di SERCA: la taspigargina.....	41

I MITOCONDRI	42
Struttura submicroscopica e funzioni.....	43
Il mitocondrio nell'omeostasi del calcio intracellulare.....	44
Il mitocondrio nel processo apoptotico.....	45
Le proteine della famiglia di Bcl-2.....	47
GFP: LA PROTEINA A FLURESCENZA VERDE	49
AEQUORINA	53
Aequorina mitocondriale.....	55
Aequorina del reticolo endoplasmatico.....	55
REAGENTI E MATERIALI	57
Reagenti.....	57
Materiali.....	58
METODI	59
Modelli cellulari e relativa tecnica di coltura.....	59
Preparazione di batteri <i>E. coli</i> competenti.....	59
Trasformazione chimica.....	60
Isolamento del DNA plasmidico da batteri.....	60
Transfezione transiente con $Ca_3(PO_4)_2$	61
Misurazione della variazione della concentrazione di calcio citoplasmatico.....	62
Misurazione della variazione della concentrazione di calcio mitocondriale.....	64
Misurazione della concentrazione di calcio del reticolo endoplasmatico.....	65
Microscopia confocale e misurazione delle variazioni del potenziale di membrana mitocondriale.....	65
Misurazione di ATP.....	67
Proliferaazione.....	68
Analisi microscopica e <i>videoimaging</i>	69
Analisi dei dati.....	70
SCOPO	71
RISULTATI	74

Le cellule HEK293-hP2X ₇ R hanno una concentrazione di calcio mitocondriale più elevata rispetto ai controlli.....	74
Le cellule HEK293-hP2X ₇ R trattate con carbacolo hanno una maggiore concentrazione citoplasmatica di calcio rispetto ai controlli.....	76
Le cellule HEK293-hP2X ₇ R possiedono una maggiore quantità di calcio nel reticolo endoplasmatico ed una maggiore attività delle pompe SERCA rispetto ai controlli.....	77
Il recettore P2X ₇ favorisce la sopravvivenza cellulare.....	80
Effetto dell'inibizione del recettore P2X ₇ sulla sopravvivenza cellulare.....	82
La degradazione dell'ATP extracellulare ha sulla sopravvivenza cellulare un effetto simile all'inibizione del recettore.....	83
Effetto dell'EGTA sulla sopravvivenza cellulare.....	84
Misurazione dell'ATP intracellulare.....	85
Le cellule HEK293-hP2X ₇ R hanno un potenziale di membrana mitocondriale più elevato rispetto alle cellule di controllo.....	87
La stimolazione farmacologica del recettore P2X ₇ determina il collasso del potenziale di membrana mitocondriale.....	89
La stimolazione farmacologica del recettore P2X ₇ determina un accumulo di calcio nei mitocondri e la loro frammentazione.....	91
La stimolazione farmacologica del recettore P2X ₇ determina anche frammentazione del RE.....	95

Stimolazione farmacologia del recettore P2X ₇ espresso in cellule HeLa.....	95
DISCUSSIONE	100
BIBLIOGRAFIA	104
RINGRAZIAMENTI	117
PUBBLICAZIONI	119

ABBREVIAZIONI

aa	aminoacidi
ADP	adenosin difosfato
AIF	fattore di induzione dell'apoptosi
AM	acetossimetilestere
AMPc	adenosinmonofosfato ciclico
Apaf-1	<i>apoptosis-activating factor-1</i>
ATP	adenosin trifosfato
ATP γ S	adenosin trifosfato gamma esse
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BzATP	2',3'-(4-benzoil)-benzoil-ATP
Ca ²⁺	ione calcio
[Ca ²⁺]	concentrazione di Ca ²⁺
[Ca ²⁺] _i	concentrazione di Ca ²⁺ intracellulare
[Ca ²⁺] _{RE}	concentrazione di Ca ²⁺ nel reticolo endoplasmatico
[Ca ²⁺] _{mt}	concentrazione di Ca ²⁺ mitocondriale
casp	caspasi
CBP	proteina che si lega a CREB
CCD	<i>charge coupled camera</i>
cDNA	DNA complementare
cit c	citocromo c
CLL	leucemia linfatica cronica
CR	calreticulina
CREB	proteina che lega l'elemento responsivo all'AMPc
Da	Dalton
dATP	deossiATP
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles' Medium</i>
$\Delta\Psi_{mt}$	potenziale di membrana mitocondriale
FADH ₂	<i>flavin adenine dinucleotide dehydrogenated</i>
FCCP	carbonil cianide α -[3-(2-benzotiazolil)6-[2-[2-[bis(carbossimrtil)amino]-5-metilfenossi]-2-oxo-2H-1-benzopiran-7yl]-b-(carbossimetil) tetrapotassio
FCS	siero fetale bovino
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Glu	acido glutammico

Gly	glicina
G418	geneticina
h	umano
H ⁺	ione idrogeno
hsp90	<i>heat shock protein</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
IAPs	inibitore dell'apoptosi
IFN	interferone
IL	interleuchina
Ile	isoleucina
InsP3	inositolo trifosfato
IP3R	recettore per l'inositolo trifosfato
K ⁺	ione potassio
KN-62	<i>4-[(2S)-2-[(5-isoquinolinylsulfonyl)methylamino]-3-oxo-3-(4-phenyl-1-piperazinyl)propyl]phenyl isoquinolinesulfonic aci</i>
Km	costante di Michaelis Menten
LPS	lipopolisaccaride
M	segmento transmembrana
2-MeSATP	2-metil ATP
αβmeATP	alfa beta metil ATP
Mg ²⁺	ione magnesio
min	minuti
Na ⁺	ione sodio
NADH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide hydrogenated</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
oATP	ATP ossidato
Phe	fenilalanina
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Pi	ortofosfato
PMCA	pompa per il calcio ATP-dipendente
PKC	fosfochinasi C
PPi	pirofosfato
PS	fosfatidilserina
PSF	<i>point spread function</i>
PTP	<i>permeability transition pore</i>

RE	reticolo endoplasmatico
REL	reticolo endoplasmatico liscio
RER	reticolo endoplasmatico rugoso
ROCCs	<i>receptor-operated Ca²⁺ channels</i>
RPTP β	<i>receptor protein tyrosine phosphatase-beta</i>
S	segmento
Ser	serina
SERCA	Ca ²⁺ -ATPasi del reticolo endoplasmatico
SMOCCs	<i>second messenger-operated Ca²⁺ channels</i>
SP	<i>sulfinpyrazone</i>
TBHQ	terbutil idrochinone
TG	tapsigargina
TM	transmembrana
TMRM	<i>tetramethylrhodamine methyl ester</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-alfa</i>
Tyr	tirosina
Val	valina
VDAC	<i>voltage-dependent anion channel</i>
VOCCs	canali voltaggio-dipendenti

INTRODUZIONE

ATP COME MESSAGGERO EXTRACELLULARE

L'ATP è un nucleotide costituito da una base azotata (adenina), da uno zucchero (ribosio) e da un'unità trifosfato che possiede due legami fosfoanidrilici. L'energia necessaria a molti processi biologici viene ricavata dall'idrolisi dell'ATP ad adenosina difosfato (ADP) e ortofosfato (Pi) oppure ad adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato (PPi) (*Figura 1*).

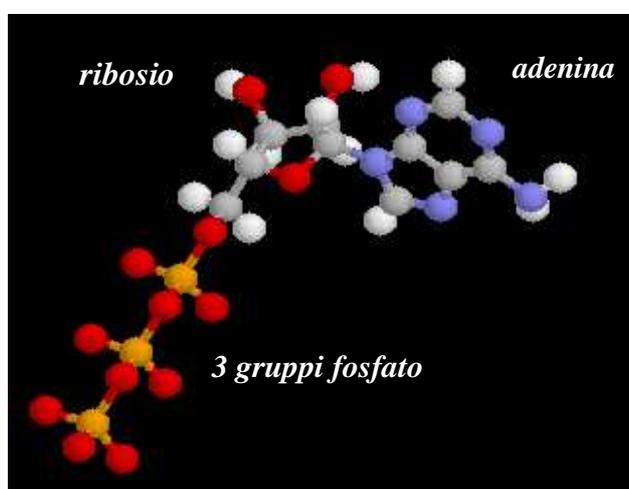


Fig. 1 Struttura tridimensionale dell'adenosin trifosfato (ATP). L'adenina è legata con legame N-glicosidico all'atomo di carbonio C-1' del pentoso mentre il primo gruppo fosforico è esterificato all'atomo di carbonio C-5'.

L'ATP rappresenta dunque, il principale donatore di energia nelle reazioni cellulari ed è coinvolto nella produzione di lavoro meccanico, nel trasporto attivo di molecole e ioni e nella sintesi di macromolecole, in quest'ultimo caso sia come donatore di energia che come precursore semplice.

Solo recentemente è stato riconosciuto all'ATP il ruolo di messaggero extracellulare. Nel 1929 Drury e Szent-Gyorgi hanno dimostrato come nel sistema cardiovascolare l'ATP

extracellulare fosse in grado di determinare una riduzione della frequenza, della forza di contrazione e della velocità di conduzione del tessuto cardiaco.

Trenta anni dopo è stato provato che l'ATP viene rilasciato durante la stimolazione antidromica dei nervi sensoriali dell'arteria dell'orecchio a concentrazioni sufficienti ad alterare il tono vascolare.

Nel 1972 Geoffrey Burnstock propose che l'ATP potesse funzionare da neurotrasmettitore rilasciato dalle terminazioni purinergiche presenti sia in neuroni del sistema nervoso centrale che in prossimità delle cellule muscolari lisce e che venisse poi riconosciuto da recettori di membrana.

Lo stesso Burnstock suggerì l'esistenza di due differenti famiglie di recettori purinergici, i P1 e i P2, in grado di mediare gli effetti indotti rispettivamente da adenosina e ATP.

Non solo i neuroni, ma anche le piastrine, le cellule endoteliali e molte cellule del sistema immunitario possono secernere ATP (Di Virgilio *et al.*, 2001).

La concentrazione citosolica dell'ATP nelle cellule di mammifero è piuttosto elevata (5-10 mM), ma raggiunge valori ben più elevati all'interno di strutture specializzate per il suo accumulo, come ad esempio i granuli densi delle piastrine e delle cellule cromaffini in cui la concentrazione di ATP può raggiungere valori di oltre 100 mM.

Funzioni dell'ATP come messaggero extracellulare

A basse concentrazioni, l'ATP coopera con fattori di crescita promuovendo la proliferazione degli epitelii, dei fibroblasti e delle cellule emopoietiche e influenza processi biologici quali l'aggregazione piastrinica, il tono vascolare, la neurotrasmissione, la funzione cardiaca e la contrazione muscolare (Gordon, 1986).

L'ATP è, inoltre, in grado di modulare diverse altre risposte tra cui la sensazione di dolore, la motilità cellulare, la secrezione di citochine ed il rilascio di ossido nitrico (Morelli *et al.*, 2001).

Studi recenti hanno dimostrato che cellule T, macrofagi e cellule della microglia rilasciano ATP nell'ambiente extracellulare a seguito di stimolazione con antigeni o endotossina batterica (LPS) (Di Virgilio *et al.*, 2001). Un significativo rilascio del nucleotide può avvenire anche in assenza di stimoli, cioè da parte di cellule a riposo (Lazarowski *et al.*, 2003).

In più, alcuni studi hanno evidenziato un effetto chemiotattico dell'ATP extracellulare. Infatti, cellule tumorali attaccate da linfociti citotossici mandano un segnale alle cellule fagocitiche e ne inducono la chemiotassi attraverso l'ATP rilasciato da lesioni della membrana provocate da perforina (Oshimi *et al.*, 1998). Non solo, ma le cellule endoteliali, oltre ad avere attività chemiotattica, proliferano se stimolate da ATP e UTP (Satterwhite *et al.*, 1999). Tale proliferazione è associata ad un incremento della concentrazione di calcio intracellulare (el-Moatassim *et al.*, 1987), produzione di diacilglicerolo e inositolo-1,4,5-trifosfato (Dubyak and Young, 1985), attivazione di MAP (*mitogen-activated protein*) chinasi (Huwiler and Pfeilschifter, 1994), traslocazione della protein chinasi C δ alla membrana plasmatici e stimolazione di chinasi ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) (Neary *et al.*, 1999). L'effetto proliferativo dell'ATP dipendente dall'attivazione dei recettori PY, è stato osservato in diversi tipi cellulari come cheratinociti (Dixon *et al.*, 1999), cellule muscolari lisce vascolari (Erlinge, 2004), cellule mesangiali (Vonend *et al.*, 2003) e astrociti (Weisman *et al.*, 2005). Inoltre, l'ATP e l'UTP agiscono, *in vitro*, da potenti fattori di crescita anche per le cellule staminali umane ematopoietiche, aumentando l'attività stimolatoria di diverse citochine su progenitori CD34⁺ (Lemoli *et al.*, 2004).

In caso di danno cellulare vengono secrete elevate quantità del nucleotide e tale rilascio rappresenta un segnale del danno stesso che stimola la risposta infiammatoria e la rigenerazione dei tessuti. Nei fluidi extracellulari la concentrazione dell'ATP è mantenuta a livelli molto bassi, nell'ordine dei 5-20 μM (Born e Kratzer, 1984) grazie alla presenza di ecto-ATPasi e fosfatasi ubiquitarie che idrolizzano il nucleotide ad ADP e fosfato organico.

Modalità di secrezione dell'ATP

L'ATP citosolico viene rilasciato nell'ambiente extracellulare attraverso tre differenti meccanismi:

- ✓ ***rilascio non regolato***: avviene per citolisi di cellule sane a seguito di un trauma tissutale.
- ✓ ***rilascio regolato***: si verifica tramite esocitosi di granuli o vescicole da parte di piastrine, cellule endocrine, terminazioni nervose purinergiche. Il rilascio di ATP è compartimentalizzato.
- ✓ ***tramite proteine di trasporto*** presenti nella membrana plasmatica quali CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Il fatto che surnatanti di cellule esprimenti il recettore contengano un'elevata concentrazione di ATP, suggerisce un diretto coinvolgimento del recettore nella traslocazione del nucleotide attraverso la membrana plasmatica (Baricordi *et al.*, 1999; Adinolfi *et al.*, 2003; Solini *et al.*, 2004; Pellegatti *et al.*, 2005).

L'elevata concentrazione citosolica, la bassa concentrazione extracellulare, il rilascio nell'ambiente pericellulare in presenza di differenti stimoli, la regolazione della sua concentrazione da parte di enzimi di membrana che ne causano la degradazione e la

presenza di recettori specifici per l'ATP fanno del nucleotide un *messaggero extracellulare*.

Enzimi regolatori della concentrazione extracellulare di ATP

La concentrazione extracellulare dei nucleotidi è regolata da diversi enzimi che si trovano associati alla membrana:

- ✓ *ecto-nucleotidasi 5'-trifosfato difosfoidrolasi (E-NTPDasi)*: apirasi (ecto-ATPDasi o CD39), che idrolizza i nucleosidi trifosfato (da ATP ad ADP) e difosfato (da ADP a AMP); ecto-ATPDasi (CD39L3), che hanno la medesima funzione dell'apirasi, ma che idrolizzano prevalentemente i nucleosidi trifosfato (preferenza di 3:1);
- ✓ *ecto 5'-nucleotidasi*: convertono nucleosidi monofosfato (AMP) a nucleosidi (adenosina);
- ✓ *ecto-fosfodiesterasi/nucleotidi pirofosfatasi (E-NPP)*: idrolizzano nucleosidi trifosfato e difosfato a nucleosidi monofosfato e cAMP ad AMP;
- ✓ *fosfatasi alcaline*: degradano nucleosidi tri-, di- e monofosfato e diversi substrati fosforilati.

Tecniche di quantificazione del rilascio di ATP

La quantità di ATP rilasciato da un monostrato di cellule epiteliali ed endoteliali è stata misurato da Schwiebert e collaboratori attraverso il sistema luciferina-luciferasi, secondo la relazione per cui, per ogni molecola di nucleotide rilasciata, viene emesso un fotone di luce che viene captato da un luminometro. Questo sistema di misurazione non è molto preciso poiché viene misurata la concentrazione di ATP presente nel mezzo di incubazione (nel quale si trova la luciferasi) e non quella in vicinanza della membrana. Ciò comporta

una sottostima della stessa che non tiene conto dell'ATP degradato dalle ecto-nucleotidasi (Beigi *et al.*, 1999).

Per ovviare a questo inconveniente, vengono utilizzate chimere in cui la luciferasi è coniugata ad una proteina di membrana. Ad esempio, la chimera proteina A-luciferasi, che richiede l'incubazione delle cellule con IgG in grado di legare un epitopo extracellulare di una proteina di membrana. L'incubazione con il complesso proteina A-luciferasi favorisce il legame della proteina A all'anticorpo e la conseguente localizzazione della luciferasi in prossimità della membrana plasmatica.

L'utilizzo di questa tecnica ha permesso la misurazione della concentrazione dell'ATP rilasciato in seguito all'attivazione delle piastrine con trombina, rilevando un rilascio transiente di ATP di circa 15-20 μM a livello della membrana e di 1-2 μM nel mezzo di incubazione (Beigi *et al.*, 1999).

Nel nostro laboratorio è stata prodotta una chimera ottenuta coniugando alla luciferasi le sequenze del recettore per il folato. L'espressione di tale proteina in membrana permette di ottenere una più precisa misurazione della concentrazione di ATP (Pellegatti *et al.*, 2005).

RECETTORI PURINERGICI

I recettori purinergici riconoscono come ligandi diversi nucleotidi extracellulari. In base ai loro ligandi conosciuti e alla loro struttura molecolare, tali recettori si suddividono in due differenti famiglie: P1 e P2.

I primi vengono a loro volta suddivisi in quattro sottotipi: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (Ralevic and Burnstock, 1998). Sono recettori di membrana accoppiati a proteine G che vengono attivati principalmente dall'adenosina, sostanza rilasciata dai tessuti in condizioni di ipossia e ischemia.

I recettori P2 (P2R), diversamente, sono principalmente attivati dal nucleotide ATP. Finora sono stati caratterizzati quindici sottotipi recettoriali P2 di mammifero, ritenuti responsabili di differenti risposte indotte dai nucleotidi. Questi recettori sono distinti in due diverse sottofamiglie: P2Y e P2X (Abbraccio and Burnstock, 1994) (**Figura 2**).

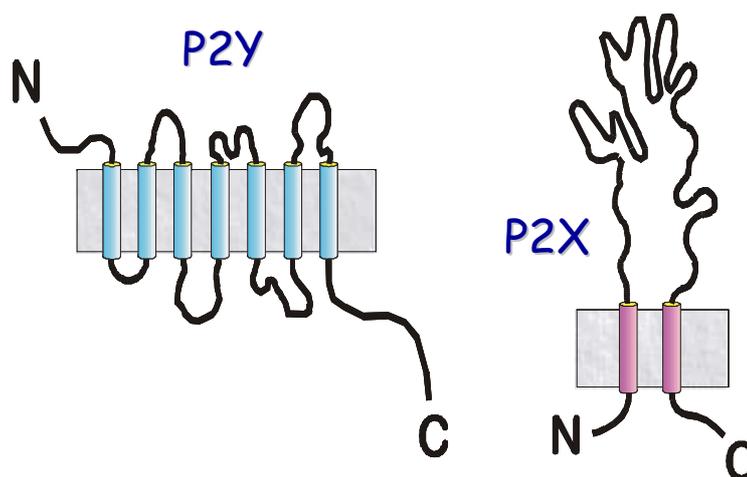


Fig. 2 Rappresentazione schematica della struttura dei recettori P2Y e P2X

I recettori P2Y sono recettori metabotropici accoppiati a proteina G costituiti da una singola catena polipeptidica che attraversa sette volte la membrana plasmatica. L'estremità N-terminale si trova a livello extracellulare, mentre quella C-terminale a livello intracellulare.

I recettori P2X sono recettori ionotropici costituiti da un'ansa extracellulare, due domini transmembrana. Sia l'estremità N-terminale che quella C-terminale sono situate nella porzione citoplasmatica.

I recettori P2X

I recettori P2X (P2XR) sono recettori ionotropici costituiti da due domini idrofobici transmembrana (TM1 e TM2), da una regione extracellulare recante 10 residui di cisterna. Le subunità dei P2XR sono glicosilate a livello di residui di asparagina (N182, N239 e N298). La delezione di almeno due di questi tre residui determina l'attivazione del canale ionico (Newbolt *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1998) (**Figura 3**). La porzione N-terminale è

costituita da circa venti-trenta residui ed è simile nei diversi sottotipi, mentre il dominio C-terminale presenta una notevole variabilità di lunghezza. Probabilmente è la vicinanza di questi due domini a consentire la corretta funzionalità del canale. Mutazioni o delezioni del dominio C-terminale determinano alterazioni funzionali alterando cinetica, permeabilità e desensitizzazione del canale ionico (Khakh, 2002).

A livello dell'ansa extracellulare sono presenti dieci residui conservati di cisteina, quattordici residui conservati di glicina e da due a sei siti potenziali di glicosilazione. Pare che tra i residui di lisina 69 e 71 si localizzi il sito di legame del recettore per l'agonista ATP e che quindi le cisteine rivestano un ruolo importante nella formazione di ponti disolfuro che permettono al recettore di mantenere la conformazione necessaria per collegare il sito di legame del nucleotide con il canale ionico (Ralevic and Burnstock, 1998) .

I recettori P2X sono a loro volta suddivisi in sette diversi sottotipi denominati: **P2X₁**, **P2X₂**, **P2X₃**, **P2X₄**, **P2X₅**, **P2X₆**, **P2X₇** (Di Virgilio *et al.*, 2001).

Le dimensioni dei recettori P2X sono variabili, dai 379 aminoacidi del recettore P2X₆ ai 595 del P2X₇ (*Tabella 1*).

Tabella 1. I recettori P2X

<i>sottotipo P2X</i>	<i>numero di aminoacidi</i>	<i>agonista preferenziale</i>
P2X₁	399	ATP
P2X₂	472	ATP
P2X₃	397	ATP
P2X₄	388	ATP
P2X₅	455	ATP
P2X₆	379	ATP
P2X₇	595	ATP

I recettori P2X sono recettori ionotropici costituiti da subunità la cui aggregazione forma canali ionici per l'ingresso nella cellula di cationi di basso peso molecolare come sodio e calcio e la fuoriuscita di potassio. Sono proteine oligomeriche costituite da subunità che formano omopolimeri o eteropolimeri (Torres *et al.*, 1999). Le subunità di P2X₂R si associano come tetrametri (Kim *et al.*, 1997), mentre i recettori P2X₁ e P2X₂ come trimeri (Nicke *et al.*, 1998). Il recettore P2X₇ non coimmunoprecipita con altri recettori P2X, mentre P2X₅R coimmunoprecipita con tutti gli altri P2XR ad esclusione di P2X₇R. Gli altri eteropolimeri identificati sono P2X₂R/ P2X₃R (Radford *et al.*, 1997), P2X₄R/ P2X₆R (Le *et al.*, 1998), P2X₂R/ P2X₆R (King *et al.*, 2000).

I recettori P2X₂, P2X₄ e P2X₇ possono presentare diversa permeabilità perché sono dotati di due stati di apertura (Surprenant *et al.*, 1996; Virginio *et al.*, 1999b). Il recettore P2X₇, per esempio, attiva un canale ionico di membrana con 0.7-0.8 nm di diametro, ma raggiunge i 4 nm quando forma un poro che viene attraversato da molecole di elevato peso molecolare (Virginio *et al.*, 1999a).

L'agonista extracellulare fisiologico dei recettori P2X è rappresentato dal nucleotide ATP. I P2XR possono venire attivati anche da $\alpha\beta$ -metilene-ATP ($\alpha\beta$ meATP) che, diversamente dall'ATP, resiste alla degradazione enzimatica e quindi può essere utilizzato per l'identificazione dei recettori anche *in vivo* (Tsuda *et al.*, 1999).

I recettori P2X sono presenti soprattutto nelle cellule eccitabili come neuroni dove svolgono un importante ruolo come mediatori della neurotrasmissione eccitatoria a livello delle terminazioni purinergiche nel sistema nervoso centrale e periferico. Recentemente è stata rilevata la presenza di questi recettori anche a livello di endotelio, piastrine, leucociti, cellule epiteliali e del sistema immune.

Il recettore P2X₁ umano è espresso prevalentemente nelle cellule muscolari lisce di vasi deferenti e della vescica oltre che nel cervello, nel cuore e nelle piastrine. Oltre all'ATP, agonisti di tale recettore sono: 2-MeSATP e $\alpha\beta$ meATP (North and Surprenant, 2000). Il recettore, il cui gene mappa 17p13.2 mostra caratteristiche simili per 88.9% a quello di ratto.

Non è ancora chiara, invece, la localizzazione cromosomica del gene che codifica per P2X₂R. Tale recettore è presente nei gangli sensoriali, nel cervello, nelle cellule cromaffini, nella retina, nella coclea e nella muscolatura liscia ed simile per 84.3% a quello di ratto. Agonisti di P2X₂R sono: 2-MeSATP, BzATP e ATP.

P2X₃R si trova nelle fibre sensoriali, cervello, cuore, coclea. Esperimenti *in vivo* hanno attribuito a questo recettore e al polimero P2X_{2/3}R un ruolo nella trasmissione del segnale nel dolore infiammatorio cronico e nel dolore neuropatico (Barclay *et al.*, 2002). Nel ratto si trova sulle cellule DRG (*dorsal root ganglia*). Il gene che codifica per il recettore mappa in 11q12 e la percentuale di identità tra le sequenze di P2X₃R umano e di ratto è del 95.6%. Agonisti di questo recettore sono: 2-MeSATP, $\alpha\beta$ meATP e ATP.

Il recettore P2X₄ (il cui gene mappa in 12q24.31) oltre ad essere espresso ad alti livelli nel cervello, è stato localizzato a livello di colon, cuore, epiteli e muscolatura liscia. Nel ratto è stato individuato in ippocampo, cervello, cellule DRG e tessuto endocrino. P2X₄R umano è simile per 88.2% a quello di ratto ed è attivato da 2-MeSATP e ATP.

Il recettore P2X₅ (il cui gene mappa in 17p13.3) si localizza a livello di cervello, cuore, spina dorsale, linfociti e timo. Nel ratto si trova a livello di gangli e cuore. Agonisti di tale recettore sono 2-MeSATP, $\alpha\beta$ meATP e ATP.

Sia nell'uomo che nel ratto il recettore P2X₆ è presente in cervello, gangli sensoriali e autonomi. Il gene mappa in 22q11 ed è stata calcolata una percentuale di identità tra i due recettori. Agonisti del recettore P2X₆ sono 2-MeSATP e ATP.

L'espressione del recettore P2X₇, il cui gene mappa in 12q24.31, è elevata nelle cellule del sistema immunitario come monociti, macrofagi, microglia, cellule dendritiche (Burnstock, 2000; North, 2003). La percentuale di identità tra il P2X₇R umano e quello di ratto è 79.7. Agonisti di questo recettore sono BzATP, ATP, 2-MeSATP e ATP γ S (North and Surprenant, 2000; Vial *et al.*, 2004).

Le cellule del sistema immunitario che esprimono i recettori P2 hanno la capacità di indurre risposte caratteristiche dell'infiammazione come l'attivazione di fattori di trascrizione NFAT ed il rilascio delle citochine infiammatorie IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ e TNF- α (Ferrari *et al.*, 2004).

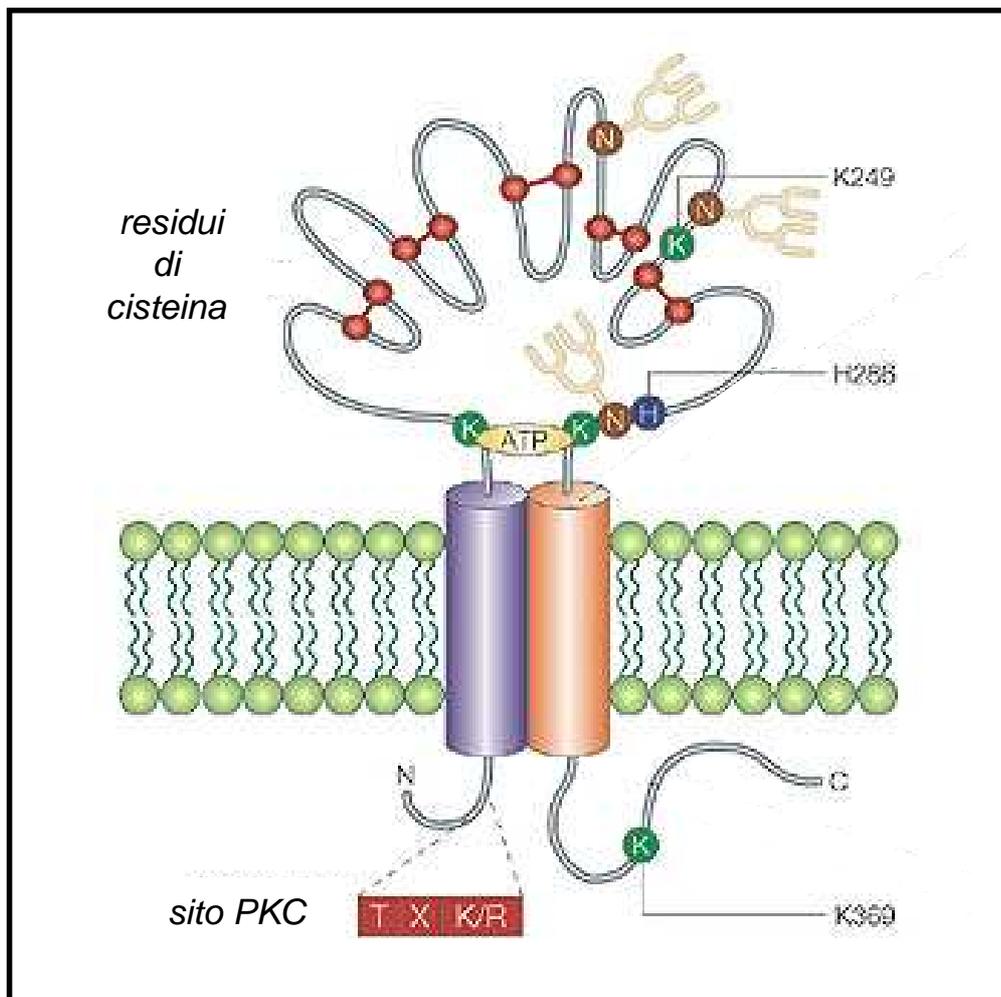


Fig. 3 Rappresentazione schematica della struttura dei recettori P2X

In blu è rappresentata la regione transmembrana 1 (TM1) e in rosso la regione transmembrana 2 (TM2). Sono inoltre evidenziati i residui cisteinici che formano ponti disolfuro, tre siti di N-glicosilazione (in giallo), il sito di legame dell'ATP ed il sito di consenso per la protein chinasi C.

IL RECETTORE P2X₇

Questo recettore è stato clonato nel 1996 e denominato P2X₇ per la sua omologia con gli altri recettori P2X (Surprenant *et al.*, 1996). Il gene di questo recettore comprende tredici esoni e nell'uomo è localizzato sul cromosoma 12q24 dal gene omologo per P2X₄ (Buell *et al.*, 1998).

Il recettore P2X₇ è espresso in numerosi tipi cellulari come neuroni, dendritiche, (Mutini *et al.* 1999; Ferrari *et al.*, 2000) macrofagi, cellule microglia (Ferrari *et al.*, 1996), fibroblasti (Solini *et al.*, 2000), linfociti (Wiley *et al.*, 1998), ma anche cellule endoteliali (von Albertini *et al.*, 1998).

I monociti esprimono il messaggero del recettore soltanto durante il differenziamento in macrofagi (Di Virgilio *et al.*, 1999). Mediatori infiammatori quali IFN- γ , TNF- α e LPS determinano un aumento dell'espressione del recettore P2X₇ (Falzoni *et al.*, 1995; Dubyak *et al.*, 1996), suggerendo un coinvolgimento del recettore nelle infezioni.

Il recettore P2X₇ è una proteina di 595 aminoacidi con una struttura molecolare simile agli altri recettori della sottofamiglia P2X. La caratteristica che differenzia il P2X₇R è la presenza di una coda C-terminale più lunga di quella degli altri P2XR (352-595 aa). Su tale estremità si trovano putativi siti di legame per l'LPS, motivi di interazione proteina-proteina e proteina-lipidi (Denlinger *et al.*, 2001) (**Figura 4**).

Come tutti i recettori della sottofamiglia P2X, P2X₇R genera un canale di membrana selettivo per i cationi come Na⁺, Ca²⁺ e K⁺. Tuttavia l'esposizione protratta oppure ripetuta all'agonista ATP determina la formazione di un caratteristico poro di membrana reversibile e permeabile a soluti idrofilici di elevato peso molecolare, fino a 900 Da, come colina (100 Da), metilglucamina (190 Da), etidio bromuro (314 Da), YO-PRO-1 (376 Da), propidio (414 Da) o *lucifer yellow* (457 Da) (**Figura 5**).

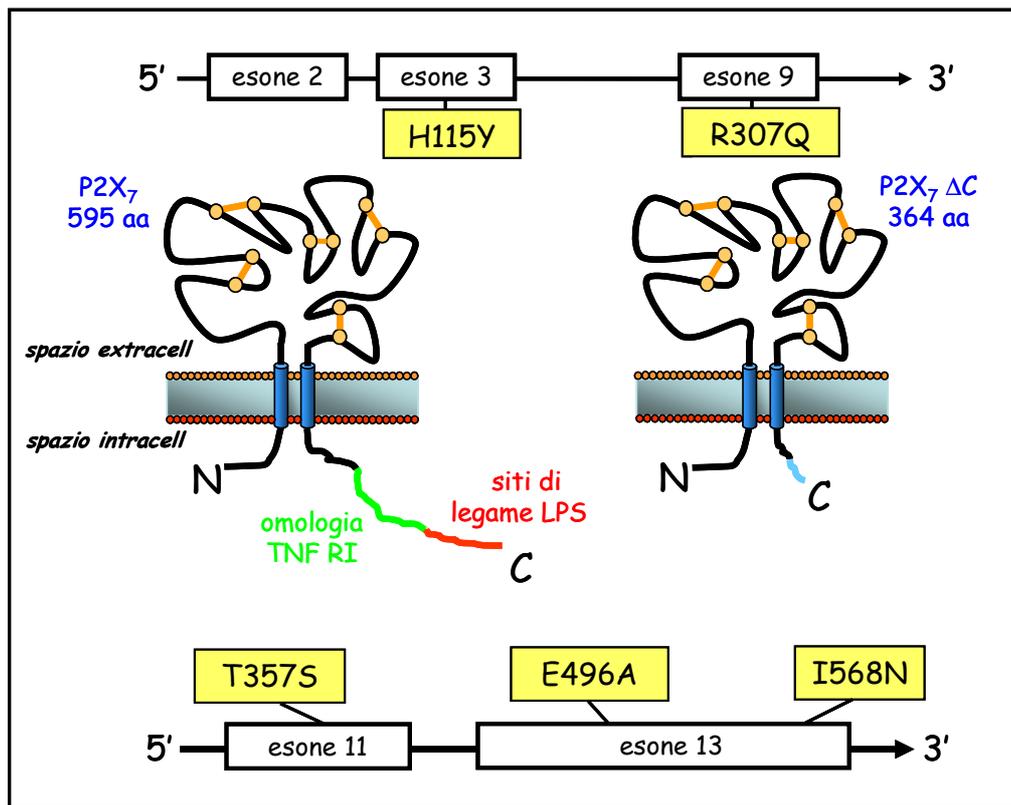


Fig. 4 Struttura del recettore $P2X_7$ nella forma nativa e troncata

Il recettore $P2X_7$ nella forma nativa (a sinistra) è costituito da 595 aa e presenta, nella coda C-terminale, un sito di omologia con la sequenza per il recettore di TNF (verde) e un sito di legame per LPS (rosso). Tali siti non sono presenti nella forma troncata del recettore (a destra), costituita da 364 aa. In figura sono inoltre riportati i polimorfismi identificati del recettore, localizzati negli esoni corrispondenti (giallo).

Il recettore purinergico P2X₇ non va incontro a desensitizzazione, pertanto il poro che si forma a seguito della stimolazione con ATP rimane aperto finché l'agonista è presente nell'ambiente extracellulare per poi chiudersi dopo la rimozione dello stesso.

Sebbene il meccanismo molecolare che determina la formazione del poro sia ancora sconosciuto, nel 1996 Surprenant e collaboratori hanno dimostrato l'importanza della coda C-terminale nella formazione del poro di membrana. Infatti la forma tronca del recettore al residuo 418 (P2X₇ΔC) è incapace di effettuare la transizione canale-poro.

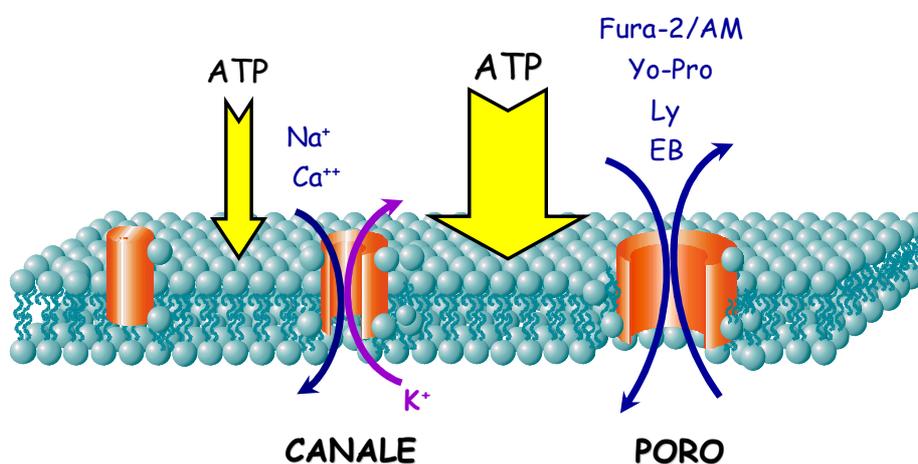


Fig. 5 Transizione del recettore P2X₇ da canale a poro di membrana

In presenza di ATP, P2X₇R media il passaggio degli ioni Na⁺ e Ca²⁺ dall'esterno all'interno della cellula e del K⁺ in direzione opposta. Applicazioni ripetute dell'agonista e concentrazioni maggiori dello stesso determinano l'apertura di un poro di membrana che permette il passaggio di molecole di dimensioni maggiori (fino a 900 Da). In figura sono rappresentati in ordine decrescente di massa, alcuni traccianti fluorescenti che vengono utilizzati per evidenziare l'aumentata permeabilità di membrana.

Nei linfociti umani B e T la stimolazione con ATP induce flussi di Na^+ e Ca^{2+} (Baricordi *et al.*, 1996) ed un aumento di permeabilità della membrana all'etidio (314 Da) ma non al propidio (414 Da) (Wiley *et al.*, 1993). Quindi con molta probabilità l'applicazione di ATP determina la formazione di un poro di membrana di dimensioni minori rispetto a quello osservato in altri tipi cellulari, permeabile a molecole di peso non superiore a 320 Da.

In macrofagi peritoneali, il recettore P2X_7 forma complessi multimerici, mentre in lisati di cellule gliali del cervello e di astrociti $\text{P2X}_7\text{R}$ si trova sotto forma di monomero (Kim *et al.*, 2001).

Esperimenti di immunoprecipitazione hanno dimostrato la presenza di undici proteine interagenti con il recettore. Tra queste $\text{RPTP}\beta$ (*receptor protein tyrosine phosphatase-beta*) e *hsp90* (*heat shock protein*) sono state indicate come proteine in grado di modulare le funzioni del recettore P2X_7 (Kim *et al.*, 2001; Adinolfi *et al.*, 2003).

Esperimenti condotti con recettori P2X_7 troncati espressi in HEK293 e in oociti di *Xenopus* hanno dimostrato l'importanza nell'estremità C-terminale di almeno 582 aminoacidi per l'attivazione del poro, diversamente, la formazione del canale avviene anche se il recettore è troncato alla posizione 380. Quindi, a differenza del poro, la formazione del canale necessita di una piccola porzione della coda intracitoplasmatica (Smart *et al.*, 2003)

$\text{P2X}_7\text{R}$ è altamente polimorfico e negli ultimi anni, sono state identificate quattro differenti sostituzioni aminoacidiche che ne causano la perdita di funzionalità.

Sia nel recettore murino che in quello umano, l'acido glutammico 496 (Glu^{496}) è importante per la formazione del poro in membrana. Infatti la sostituzione di Glu^{496} con alanina (E496A) comporta la perdita di funzionalità del recettore in individui omozigoti per la mutazione e una riduzione di circa il 50% in soggetti eterozigoti (Gu *et al.*, 2001).

Non solo, ma la sostituzione a livello della coda C-terminale di isoleucina (Ile568) con asparagina (I568N) determina mancata espressione di P2X₇R sulla membrana (Wiley *et al.*, 2003). Inoltre, la sostituzione dell'aminoacido privo di carica, glutammina, in posizione 307 con l'aminoacido fortemente carico, arginina (R307Q), determina la perdita di funzionalità da parte del recettore perché viene impedito il legame dell'ATP al dominio extracellulare dello stesso.

Nel nostro laboratorio è stato scoperto, in linfociti umani di pazienti affetti da leucemia linfatica cronica (CLL), il primo polimorfismo (sostituzione di istidina in posizione 155 con tirosina H155Y) che determina un aumento di attività del recettore (Cabrini *et al.*, 2005) (**Figura 4**).

Il recettore P2X₇ viene attivato dall'agonista ATP, in particolare dalla sua forma tetranionica (ATP⁴⁻). Nelle soluzioni fisiologiche l'ATP⁴⁻ è complessato da ioni Mg²⁺, Ca²⁺ o H⁺, formando MgATP²⁻, CaATP²⁻ e HATP³⁻. La rimozione di Mg²⁺ e Ca²⁺ e l'alcalinizzazione del terreno aumentano l'affinità dell'ATP e del BzATP (analogo farmacologico dell'ATP) per P2X₇R (Cockroft and Gomperts, 1979; Pizzo *et al.*, 1991; Rassendren *et al.*, 1997). Ulteriori agonisti P2X₇R sono: 2-MeSATP e ATPγS; tali composti risultano comunque meno efficaci rispetto all'ATP (North *et al.*, 2000).

P2X₇R umano presenta caratteristiche peculiari rispetto a quello murino o di ratto. In particolare, sembra richiedere una concentrazione di agonista 10 volte superiore per essere attivato (1 mM ATP, 100 μM BzATP).

Per quanto concerne gli antagonisti di P2X₇R, il composto KN-62 è in grado di inibire in maniera reversibile il recettore umano e di ratto e non quello di altre specie (Adinolfi *et al.*, 2005), mentre oATP determina blocco irreversibile non solo di P2X₇R ma anche degli altri P2X, in particolare P2X₁R e P2X₂R (Di Virgilio, 2003).

Il recettore P2X₇: ruolo nella proliferazione e nell'apoptosi

Studi recenti hanno messo in evidenza come il recettore P2X₇ svolga un ruolo sia nella *proliferazione cellulare* che nell'*apoptosi*, a seconda dei meccanismi intracellulari e della fase del ciclo cellulare in cui la stimolazione del recettore si verifica.

Baricordi e collaboratori hanno dimostrato, infatti, che cellule transfettate con il cDNA del recettore acquisiscono la capacità di sopravvivere e proliferare in assenza di siero, caratteristica propria delle cellule tumorali. La proliferazione sembra facilitata da un rilascio autocrino/paracrino di ATP, infatti le cellule esprimenti il recettore P2X₇ rilasciano una quantità di ATP quattro volte superiore rispetto a quella rilasciata dalle cellule che non lo esprimono. L'incubazione con apirasi o con inibitori del recettore prevengono, infatti, la proliferazione (Baricordi *et al.*, 1999).

L'aumentata proliferazione è una caratteristica delle cellule tumorali e queste ultime mostrano spesso una alterazione dell'espressione di P2X₇R. Infatti cellule di carcinoma mammario mostrano una intensa espressione del recettore sia nel nucleo che nel citoplasma e l'immunoreattività si trasferisce alla membrana nelle forme maggiormente invasive (Slater *et al.*, 2004b).

Al contrario del tessuto prostatico sano, il tessuto prostatico neoplastico esprime il recettore P2X₇, in particolare a livello del citosol e della membrana apicale delle cellule epiteliali (Slater *et al.*, 2004a).

Un elevato livello di espressione del recettore P2X₇ è stato riscontrato anche in linfociti B del sangue periferico di pazienti affetti da leucemia linfocitica cronica (B-CLL), maggiore nella variante aggressiva rispetto alla forma indolente. Secondo Adinolfi e colleghi, una limitata attivazione del recettore indurrebbe proliferazione cellulare, mentre la stimolazione acuta con dosi elevate di ATP sarebbe la causa della morte dei linfociti neoplastici (Adinolfi *et al.*, 2002).

La stimolazione ripetuta del recettore purinergico P2X₇ con elevate concentrazioni dell'agonista ATP, può causare la morte cellulare per apoptosi accompagnata da caratteristiche modificazioni cellulari come condensazione nucleare, frammentazione del DNA e attivazione di alcune caspasi come casp-1, -3 e -8 in cellule microgliali (Ferrari *et al.*, 1999). Le cinetiche di attivazione di questi enzimi sono differenti e anche i *pathways* che le determinano sembrano essere indipendenti tra loro.

Il recettore P2X₇ è anche in grado di innescare l'attività della proteina chinasi attivata da stress SAPK/JNK. Questo processo è estremamente rapido (inizia circa dopo 5 minuti) ed è, in questo caso, indipendente dalle caspasi. SAPK fosforila fattori di trascrizione quali ATF2, Ets e c-Jun in risposta a diversi stress cellulari tra cui le citochine infiammatorie. Molte delle vie su cui è in grado di agire sono poi coinvolte nella risposta infiammatoria, come l'induzione di E-selectina indotta da TNF- α , di NF- κ B nei linfociti T, e una serie di effetti pro- o anti-apoptotici in vari tipi cellulari.

Studi recenti hanno dimostrato che a seguito di una breve attivazione del recettore, si verifica l'esposizione reversibile di fosfatidilserina (PS) sulla membrana plasmatica (MacKenzie *et al.*, 2001). Tale fenomeno di risposta cellulare, definito come pseudoapoptosi, è calcio dipendente ed è accompagnato da disgregazione delle proteine del citoscheletro, evaginazioni della membrana plasmatica e rigonfiamento dei mitocondri. Inoltre, la stimolazione prolungata del recettore causa il rilascio di citocromo c (cit c) dai mitocondri, evento tipico della morte cellulare per apoptosi (MacKenzie *et al.*, 2005).

In cellule THP-1 e HEK293 transfettate con P2X₇R in seguito all'esposizione di PS, si verifica il rilascio di microvescicole contenenti la citochina proinfiammatoria IL-1 β (MacKenzie *et al.*, 2001).

IONE CALCIO COME SECONDO MESSAGGERO

L'omeostasi del calcio all'interno della cellula

Lo ione calcio (Ca^{2+}) è un secondo messaggero in quanto trasmette alla macchina biochimica della cellula i segnali elettrici e chimici che giungono dalla superficie della membrana plasmatica.

Una variazione della concentrazione citoplasmatica del catione ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) è in grado di innescare eventi biologici diversi, quali la contrazione muscolare, la secrezione ed il movimento.

La concentrazione citoplasmatica di calcio della cellula eucariotica a riposo varia tra 60 e 200 nM, a seconda del tipo cellulare, nonostante una concentrazione extracellulare di 1-2 mM ed un potenziale di membrana, negativo verso l'interno, variabile da -10 mV a -70 mV, che porterebbero la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ all'equilibrio termodinamico a valori di circa 0.1-0.2 M.

Il mantenimento di una tale differenza di concentrazione tra l'interno e l'esterno della cellula è il risultato dell'azione coordinata di differenti sistemi che comprendono le vie di influsso e di efflusso del Ca^{2+} attraverso la membrana citoplasmatica, i sistemi tampone ed i depositi intracellulari.

Canali del calcio sulla membrana plasmatica

L'ingresso di calcio dall'ambiente extracellulare avviene attraverso i canali di membrana. Tali proteine formano strutture che mettono in comunicazione il citoplasma con l'esterno della cellula. I canali possono essere divisi in più categorie in base al meccanismo che controlla la transizione dalla forma "aperta" a quella "chiusa".

1) **Canali chemio-dipendenti:** presenti in tutte le cellule, richiedono per la loro attivazione e quindi apertura, l'esistenza di un segnale extracellulare di natura chimica. Questi canali possono a loro volta essere suddivisi in base al meccanismo di attivazione in:

a) *Canali calcio regolati da recettore (receptor-operated Ca^{2+} channels: ROCCs)*. In questi canali, il sito di legame del ligando ed il canale sono compresi nella stessa proteina o fanno parte dello stesso complesso molecolare. Questi canali si aprono in seguito al legame di un agonista esterno, senza l'intervento di secondi messaggeri. Ne sono un esempio i canali di tipo P2X il cui ligando è ATP extracellulare.

b) *Canali la cui attivazione è mediata da proteina G (G protein-operated Ca^{2+} channels: GOCCs)*.

c) *Canali attivati da un secondo messaggero (second messenger-operated Ca^{2+} channels: SMOCCs)*. L'apertura di questi canali è controllata da un messaggero citosolico diffusibile, la cui produzione è indotta dall'interazione ligando-recettore.

d) *Canali attivati dallo svuotamento dei depositi intracellulari (store-operated Ca^{2+} channels: SOCCs)*. Il meccanismo di attivazione di tali canali è ancora incerto.

2) ***Canali voltaggio-dipendenti (VOCCs)***: la loro presenza è stata rilevata sia in cellule eccitabili, come le cellule nervose e le fibre muscolari, sia in cellule non eccitabili come i fibroblasti. La loro apertura è conseguente alla depolarizzazione della membrana plasmatica.

Meccanismi di estrusione del calcio

I meccanismi di efflusso del calcio attraverso la membrana plasmatica sono riconducibili all'esistenza di due differenti sistemi di espulsione: la pompa per il calcio ATP-dipendente (PMCA) e lo scambiatore Na^+/Ca^{2+} .

La calcio ATPasi, che si trova nella membrana citoplasmatica di tutte le cellule eucariote, rappresenta la principale via di uscita del Ca^{2+} nelle cellule non eccitabili. Essa viene attivata tramite interazione con il complesso Ca^{2+} -calmodulina.

Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ rappresenta un sistema elettrogenico. Esso promuove lo scambio di Na^+ e Ca^{2+} secondo un rapporto stechiometrico 3:1, alterando di conseguenza la distribuzione di carica ai due lati della membrana. Rispetto alla calcio ATPasi è un sistema a minor affinità ed è quindi logico supporre che esso abbia un ruolo rilevante nell'espulsione del calcio solo ad elevate concentrazioni citoplasmatiche di quest'ultimo.

Depositi di calcio intracellulari

L'aumento della concentrazione citoplasmatica di calcio è determinato dall'ingresso di Ca^{2+} dal mezzo esterno e dal rilascio dello ione da organuli intracellulari (depositi).

I mitocondri sono caratterizzati da un potenziale di membrana di circa -180 mV, rispetto al citosol, negativo all'interno, che produce una elevata *driving force* per l'accumulo di calcio. Questo potenziale porterebbe la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ all'equilibrio, ad un valore di circa 0.1 M. Tale valore, incompatibile con la vita di questo organello, è prevenuto dall'azione coordinata di sistemi di ingresso e di efflusso dello ione. A livello della membrana mitocondriale interna è presente un sistema uniporto che induce un rapido ingresso di calcio solo quando la sua concentrazione citoplasmatica raggiunge valori micromolari. Di conseguenza, in condizioni di riposo, i mitocondri non accumulano grandi quantità di calcio perché la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ è di circa 50-100 nM.

La liberazione dello ione dai depositi cellulari è mediata dal sistema degli inositoli fosfati. La formazione di inositolo 1,4,5-trifosfato (InsP3) può essere indotta dall'attivazione di due diversi sistemi di traduzione, uno legato all'attivazione di proteine G e l'altro all'attivazione di tirosin chinasi. Questi meccanismi determinano l'attivazione della fosfolipasi C che idrolizza il fosfolipide precursore, il fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato, in InsP3 e diacilglicerolo. L'InsP3 liberato nel citosol induce la mobilitazione di calcio dal reticolo sarco/endoplasmatico legandosi al recettore specifico (IP3R) che funziona come

un canale calcio. Il richiamo di Ca^{2+} nei depositi è effettuato dalle pompe SERCA (Ca^{2+} -ATPasi del reticolo sarco-endoplasmatico). Esistono infine depositi intracellulari di Ca^{2+} insensibili all'InsP3, come il complesso del Golgi, le vescicole secretorie e altri organuli citoplasmatici che, benchè contengano una quantità consistente di calcio, non sono in equilibrio dinamico con il citosol e quindi svolgono un ruolo marginale nel controllo della $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Sistemi tampone per il calcio

Oltre ai depositi appena illustrati, all'interno nella cellula eucariote esistono sistemi in grado di "tamponare" ampi aumenti della concentrazione citosolica di calcio. Sono costituiti da un insieme di proteine estremamente eterogeneo per affinità e capacità di legare il calcio, che nella cellula svolgono un'azione enzimatica calcio-dipendente o regolatoria. Una di queste è la calmodulina che, oltre a svolgere un ruolo importante nella modulazione di processi fisiologici (regolando, ad esempio, l'attività della calcio ATPasi), rappresenta anche la proteina citoplasmatica più importante in grado di legare calcio, in virtù della sua elevata concentrazione e della presenza in essa di quattro siti di legame per questo ione.

Ione calcio e proliferazione

Il calcio è un secondo messaggero che controlla numerose funzioni comprese la crescita, la differenziazione e la proliferazione cellulare.

Il segnale calcio consiste in un incremento della concentrazione citosolica dello ione libero in seguito all'apertura dei canali calcio presenti sulla superficie cellulare o sulla membrana del reticolo sarco/endoplasmatico.

La proliferazione cellulare è sostenuta da un incremento della $[Ca^{2+}]_i$ associato alla variazione dell'espressione di proteine trasportatrici di calcio e all'attivazione dei fattori di trascrizione come CREB (proteina che lega l'elemento responsivo all'AMPc) o NFAT (fattore nucleare che attiva i linfociti T), entrambi coinvolti nel controllo del ciclo cellulare.

Questi fattori di trascrizione sono attivati da differenti segnali calcio ed esercitano un'azione opposta sulla proliferazione cellulare (Arnould *et al.*, 2002; Baksh *et al.*, 2002; Caetano *et al.*, 2002; Giebler *et al.*, 2000; Neal *et al.*, 2003).

L'influsso di calcio attraverso le pompe VOCCs stimola la fosforilazione di CREB attraverso CaMchinasi, una protein chinasi calcio/calmodulina dipendente, e facilita la sua interazione con la proteina che si lega a CREB (CBP) o con la proteina p300 (Arias *et al.*, 1994; Chrivia *et al.*, 1993; Kwok *et al.*, 1994; Lundblad *et al.*, 1995)

CBP e p300 si legano ad una sequenza specifica di DNA inducendo la trascrizione del gene che codifica p53, un fattore di trascrizione che, attivando p21, arresta il ciclo cellulare in fase G1 (Avantaggiati *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2001).

Si suppone, quindi, che la fosforilazione di CREB indotta dall'influsso di calcio attraverso VOCCs, abbia lo scopo di mantenere la cellula allo stato quiescente.

Al contrario, un incremento sostenuto del calcio citosolico attiva la calcineurina, una fosfatasi calcio/calmodulina dipendente, che defosforila NFAT (Dolmetsch *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1997).

NFAT è un fattore di trascrizione inizialmente descritto in linfociti T. Dei cinque differenti isomeri conosciuti, quattro (NFATc1-c4) sono regolati dall'azione della fosfatasi calcio/calmodulina dipendente e dalla calcineurina (Crabtree *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 1997).

In cellule non stimolate, le proteine NFAT sono localizzate nel citoplasma in forma inattiva. Un incremento della concentrazione citoplasmatica di calcio attiva la calcineurina

che defosforila NFAT che, in questa forma, migra nel nucleo dove si lega alle sequenze promotrici.

L'attivazione calcineurina-dipendente può essere inibita da chinasi specifiche che rifosforilano NFAT che torna nel citoplasma.

È stato osservato che la mancanza del fattore NFATc1 inibisce la proliferazione di linfociti T (Ranger *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 1998); nel cuore, NFATc1 è espresso solo nelle cellule endoteliali e topi che mancano di questo fattore evidenziano problemi nella morfogenesi cardiaca (Ranger *et al.*, 1998a, b). Si può affermare quindi, che l'attivazione del fattore NFAT sia legata al processo di proliferazione cellulare.

NFATc1 controlla la progressione del ciclo cellulare attraverso l'attivazione della ciclina D1, della ciclina D2, della proteina Rb e del gene *c-myc* richiesti per il passaggio dalla fase G1 alla fase S (Neal *et al.*, 2003).

In conclusione, nelle cellule quiescenti, il segnale calcio favorisce la fosforilazione di CREB promuovendo l'arresto del ciclo cellulare in fase G1; la presenza di agonisti che determinano un incremento sostenuto della concentrazione citoplasmatica di calcio, favorisce l'attivazione di NFAT che promuove il ciclo cellulare.

Il calcio e la sintesi di ATP nei mitocondri

La maggior parte dell'ATP intracellulare deriva dalla glicolisi citosolica e dalla fosforilazione ossidativa mitocondriale. Quest'ultima utilizza la catena respiratoria e produce ATP attraverso l'ATP sintetasi mitocondriale.

La presenza dei cofattori ridotti (NADH, FADH₂) è assicurata dall'ossidazione mitocondriale di substrati che derivano da glucosio, acidi grassi, aminoacidi. Tuttavia il processo di fosforilazione ossidativa è regolato anche dall'interazione tra il metabolismo mitocondriale e quello citosolico. In questo senso, l'omeostasi del calcio mitocondriale

ricopre un ruolo importante come dimostra il fatto che tre deidrogenasi del ciclo di Krebs (piruvato deidrogenasi, isocitrato deidrogenasi, α -chetoglutarato deidrogenasi) sono modulate dalla concentrazione di calcio.

Studi su cellule HeLa e colture primarie di miotubi scheletrici hanno analizzato gli effetti del segnale calcio mitocondriale e citosolico sulla concentrazione di ATP cellulare. I risultati dimostrano che una variazione della concentrazione di calcio mitocondriale agonista-dipendente attiva il metabolismo mitocondriale con conseguente aumento della concentrazione di ATP nei mitocondri e quindi nel citoplasma. Tale evento dipende dalla consistenza dell'aumento di calcio e dalla disponibilità di substrati mitocondriali (Jouaville *et al.*, 1999).

Allo stesso modo una diminuzione nell'accumulo di calcio all'interno dei mitocondri determina un calo della concentrazione di ATP mitocondriale.

Dal medesimo studio è emerso che i transienti calcio inducono un aumento della concentrazione di ATP cellulare anche a lungo termine.

Posto che la produzione di ATP stimoli la proliferazione cellulare, si può quindi raggiungere lo stesso risultato senza sottoporre la cellula ad un sostenuto ingresso di calcio che la porterebbe a morte.

IL RETICOLO ENDOPLASMATICO

Struttura submicroscopica e funzioni

Il reticolo endoplasmatico (RE) è un complesso sistema di membrane che circoscrivono cavità in parte intercomunicanti (**Figura 6**). E' presente in tutte le cellule eucariotiche e ha una estensione variabile a seconda del tipo e dell'attività cellulare.

La rete tridimensionale di cavità chiuse è delimitata da una membrana unitaria che invade il citoplasma dividendolo in due fasi:

- ✓ *fase interna*, racchiusa dalle membrane;
- ✓ *fase esterna*, in continuità con lo ialoplasma.

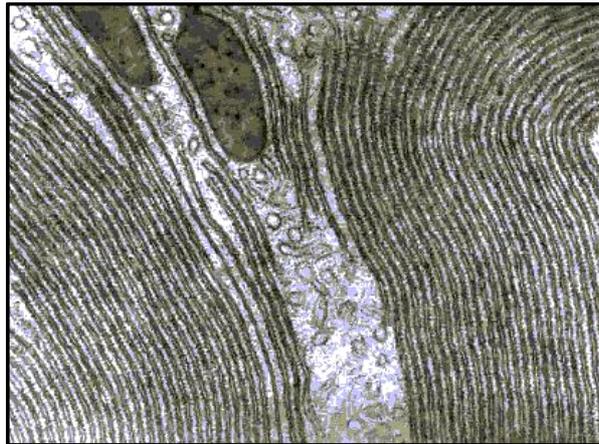


Fig. 6 Foto al microscopio elettronico della struttura del reticolo endoplasmatico

A livello del nucleo della cellula questo sistema membranoso si continua con la membrana nucleare, permettendo un collegamento diretto tra le cavità del reticolo e le cisterne perinucleari.

In base all'aspetto della membrana, si possono individuare due diversi compartimenti: il reticolo endoplasmatico rugoso (RER) ed il reticolo endoplasmatico liscio (REL).

Il reticolo endoplasmatico rugoso è costituito da ampie cisterne appiattite spesso addossate tra loro a formare sistemi lamellari paralleli che occupano buona parte del citoplasma. Adesi alla superficie si trovano ribosomi che danno la caratteristica granulazione e la basofilia.

Il reticolo endoplasmatico liscio, invece, non presenta ribosomi sulla sua superficie ed è costituito da un sistema chiuso di vescicole tubuliformi intercomunicanti che si anastomizzano.

Per quanto riguarda le funzioni del RE, è bene distinguere quelle proprie dei ribosomi da quelle che riguardano la componente membranosa.

Le membrane del RE sono fondamentali nel processo di *scambio di sostanze* che avviene tra il compartimento esterno (matrice ialoplasmatica) ed il compartimento interno. Gli scambi possono avvenire sia mediante diffusione, sia mediante meccanismi di trasporto attivo.

Il RER ha un ruolo fondamentale nel processo di *secrezione delle proteine* che vengono prodotte a livello dei ribosomi e che sono destinate ad essere trasportate all'esterno della cellula.

Inoltre a livello del RE si verificano importanti *modificazioni post-traduzionali* delle molecole polipeptidiche e dei lipidi di membrana (Baumann and Walz, 2001; Sitia and Braakmann, 2003). Infatti, la catena polipeptidica acquista le strutture secondaria e terziaria mediante l'instaurarsi di legami deboli tra i residui aminoacidici e la formazione di legami disulfidrilici tra i residui di cisteina.

Nel RER, durante l'allungamento della catena polipeptidica sul ribosoma, avviene la *glicosilazione* delle glicoproteine e dei peptidoglicani mediante il legame di catene laterali oligosaccaridiche alla catena polipeptidica.

Oltre a rivestire un importante ruolo nella motilità cellulare, nel metabolismo mitocondriale e nell'espressione genica nel ciclo cellulare e nell'apoptosi (Berridge, 2002), il RE interviene anche nei processi di **eliminazione di cataboliti** e di **accumulo** di sostanze elaborate dalla cellula. Il prodotto che deve essere eliminato o immagazzinato viene versato nella cavità del reticolo e concentrato in vacuoli digestivi del RE o del complesso di Golgi. Questi vacuoli sono delimitati da una membrana e contengono enzimi lisosomiali per la degradazione dei cataboliti.

Pare inoltre, che il RE sia coinvolto nei processi che portano alla demolizione del glicogeno (**glicogenolisi**) e al successivo trasporto attivo di glucosio.

Nel lume di questo organello è presente una elevata quantità di proteine che svolgono un ruolo importante nel controllo delle funzioni del RE stesso (Corbett and Michalak, 2000; Molinari and Helenius, 2000; Baumann and Walz, 2001; Jacob *et al.*, 2001b). Molte di queste legano e immagazzinano il Ca^{2+} funzionando da molecole *chaperones* le quali svolgono un ruolo importante nel giusto ripiegamento delle proteine e nel controllo della sintesi proteica, prevenendo la formazione di proteine ripiegate scorrettamente (Molinari and Helenius, 2000).

Se all'interno del RE si verifica un accumulo di proteine non ripiegate o la riduzione della concentrazione di Ca^{2+} , la cellula risponde attraverso l'espressione di proteine *chaperones* del RE (Gething and Sambrook, 1992), l'attivazione di segnali nucleari volti a bloccare la sintesi proteica e la degradazione delle proteine (Jeffery *et al.*, 2000).

Il REL interviene nel **metabolismo dei lipidi e dei fosfolipidi** e partecipa alla **biosintesi di ormoni steroidei** come testosterone, ormoni estrogeni, progesterone ed ormoni corticosteroidali. Alla biosintesi di questi ormoni partecipano anche i mitocondri mediante un processo di tipo cooperativo. Questi due sistemi infatti, contengono enzimi diversi che intervengono in tappe successive della steroidogenesi.

Le membrane del REL di alcune cellule, in particolare quelle epatiche, prendono parte a processi enzimatici di *idrossilazione*, *deaminazione* e *ossidazione* di composti esogeni ed endogeni indispensabili per la detossificazione di farmaci.

Diversi studi hanno dimostrato che l'indebolimento della funzione di controllo del RE è correlato a danni vascolari come infarto miocardico e aterosclerosi (Brooks, 1997), a malattie neurodegenerative, in particolare l'Alzheimer (Soti and Csermely, 2002), a malattie sistemiche come fibrosi cistica (Chevet *et al.*, 1999), a malattie da prioni, encefalopatia spongiforme bovina e la variante umana Creutzfeldt-Jacob (Jeffery *et al.*, 2000) e al cancro (Li *et al.*, 2001).

Il reticolo endoplasmico come deposito intracellulare di calcio

Il RE rappresenta il più importante deposito intracellulare di Ca^{2+} . La concentrazione del catione libero risulta circa 1000 volte superiore a quella del citoplasma.

Il calcio è essenziale per numerosi processi cellulari come la proliferazione, la differenziazione, la trascrizione, la sintesi proteica e di steroidi, la secrezione e l'apoptosi.

Nel RE sono espressi tre differenti tipi di trasportatori del calcio:

- ✓ *IP₃R (recettore per l'inositolo 1,4,5-trifosfato)* che rilascia il calcio dal RE;
- ✓ *RyR (recettore della rianodina)* anch'esso coinvolto nel rilascio di calcio dal RE;
- ✓ *pompe SERCA (calcio-ATPasi del reticolo sarco/endoplasmatico)* che permettono il passaggio del calcio dal citoplasma al RE.

Il calcio all'interno del RE attiva una cascata trascrizionale che regola le proteine *chaperones* responsabili del corretto ripiegamento delle proteine e della regolazione di altre coinvolte nella risposta da *stress* e nel processo apoptotico (Berridge, 2002; Breckenridge *et al.*, 2003a).

Infatti, circa il 30% delle proteine cellulari è sintetizzato nel RE e viene trasportato ai compartimenti intracellulari, alla membrana plasmatica o nell'ambiente extracellulare grazie a molecole *chaperones* (Ghaemmaghami *et al.*, 2003).

La quantità totale di Ca^{2+} presente nel RE è aumentata dalla presenza di una proteina tampone a bassa affinità, la calreticulina (CR). La CR è una glicoproteina di 46 kDa caratterizzata dalla presenza nella porzione C-terminale di residui aminoacidici acidi che legano il Ca^{2+} con bassa affinità ed elevata capacità. Questa proteina, trovandosi a livello del lume del RE, nelle vicinanze dei canali per il Ca^{2+} , permette di tamponare questo ione e di accumularne grosse quantità senza che si instauri un gradiente di concentrazione elevato. Successivamente il Ca^{2+} legato alla CR può essere velocemente rilasciato all'apertura dei canali del Ca^{2+} grazie alla scarsa affinità di legame con le proteine.

A livello del RE sono presenti ulteriori proteine di membrana (come la calnexina) e intraluminari (BiP e PDI) capaci di legare Ca^{2+} a bassa affinità. Queste proteine funzionano come tamponi per il Ca^{2+} intraluminale e favoriscono il corretto *fold*ing delle proteine neosintetizzate, processo a sua volta Ca^{2+} -dipendente.

Quindi il RE rappresenta un deposito di Ca^{2+} InsP3-sensibile, in equilibrio dinamico con il citoplasma. La presenza di Ca^{2+} intraluminale è indispensabile per la regolazione dei processi fisiologici che avvengono all'interno dell'organello. È stato dimostrato che la deplezione del deposito InsP3-sensibile oltre a bloccare la sintesi proteica (Preston and Berlin, 1992), causa la frammentazione del RE (Subramanian and Meyer, 1997) e la secrezione di proteine luminali per la mancanza dei meccanismi regolatori del processo di maturazione della proteina nel RE (Booth and Koch, 1989).

In conclusione quindi, la regolazione della $[\text{Ca}^{2+}]$ a livello del RE è fondamentale per due motivi:

1. il RE rappresenta il *principale deposito intracellulare di Ca^{2+} della cellula* (dati recenti riferiscono di concentrazioni dell'ordine di circa 1 mM di Ca^{2+} nel lume, rilasciabile in seguito a stimolazione) (Montero *et al.*, 1995);
2. il Ca^{2+} interviene nella regolazione di alcune delle funzioni dello stesso RE, come ad esempio il *sorting delle proteine*.

Le calcio ATPasi SERCA

Le pompe SERCA sono calcio ATPasi costituite da una regione idrofobica transmembrana e da una regione idrofilica che protrude nel citosol (Herbette *et al.*, 1977) (**Figura 7**). La regione idrofobica è costituita da 10 segmenti transmembrana (M1-M10) organizzati ad elica (MacLennan *et al.*, 1985). Le due regioni sono legate insieme da 5 segmenti (S1-S5). I domini C- e N-terminale sono entrambi citosolici (Matthews *et al.*, 1989).

Nei segmenti M4, M5, M6 e M8 si trovano i residui ricchi di ossigeno che formano due siti di alta affinità per il calcio (Toyoshima *et al.*, 2000) che formano una cavità attraverso cui avviene la traslocazione degli ioni calcio (MacLennan *et al.*, 1997).

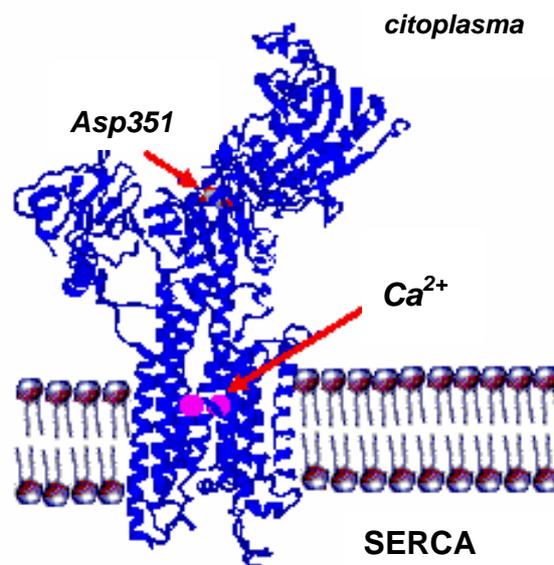


Fig. 7 *Struttura delle pompe SERCA*

Rappresentazione schematica della conformazione ad alfa elica delle pompe SERCA e dei due siti di legame per il calcio.

La lunga ansa tra S4 e S5 contiene residui coinvolti nell'idrolisi di ATP (Lee and East, 2001).

Il sito di legame della tapsigargina, potente e specifico inibitore delle SERCA (Lytton *et al.*, 1991) si trova nella regione costituita dalle anse M3/M4 e M7/M8 (Yuong *et al.*, 2001).

Distribuzione delle SERCA

Le pompe SERCA sono classificate in tre gruppi: **SERCA 1**, **SERCA 2** e **SERCA 3**.

Nell'uomo, i tre geni che codificano queste proteine sono collocati nei cromosomi 16, 12 e 17 per SERCA 1, 2 e 3 rispettivamente (Dode *et al.*, 1996; MacLennan *et al.*, 1987).

Ad oggi sono conosciute 7 diverse isoforme (**SERCA 1a e b**, **SERCA 2a e b** e **SERCA 3a, b e c**) che differiscono per la sequenza C-terminale (Andersen and Vilsen, 1998).

SERCA 1a è espressa esclusivamente nelle fibre muscolari veloci, mentre SERCA 1b in quelle fetali (Brandl *et al.*, 1987).

SERCA 2a si trova nel muscolo cardiaco e nelle fibre muscolari lente (Brandl *et al.*, 1987), mentre SERCA 2b è una proteina costitutiva (Carafoli and Brini, 2000).

L'espressione di SERCA 3 è limitata ad alcuni tessuti compreso quello muscolare (Carafoli and Brini, 2000).

Caratteristiche delle tre differenti isoforme di SERCA

In vitro, non sono state rilevate differenze funzionali tra SERCA 1a e SERCA 1b dal punto di vista funzionale (Dode *et al.*, 1998). Tuttavia, anche se il *turnover* di SERCA 1 è due volte più veloce rispetto a quello di SERCA 2a (Sumbilla *et al.*, 1999), la loro affinità per

il calcio è simile (Lytton *et al.*, 1992). L'affinità di SERCA 2b ($K_m \sim 0.17 \mu\text{M}$) è due volte maggiore di quella di SERCA 2a ($K_m \sim 0.31 \mu\text{M}$) (Verboomen *et al.*, 1992).

Studi funzionali su SERCA 3 hanno mostrato che questa ATPasi ha proprietà diverse dalle altre isoforme. Ha una bassa affinità per il calcio ($K_m \sim 20 \mu\text{M}$) (Arredouani *et al.*, 2002a), un pH ottimale elevato (7.2-7.4 contro 6.8-7.0) ed una elevata sensibilità all'inibizione causata da vanadato (Wuytack *et al.*, 1995). L'affinità per l'ATP è simile per tutte le isoforme (0.02-0.05 μM).

Inibizione farmacologica delle SERCA: la tapsigargina

Il più potente e specifico inibitore conosciuto per tutte le isoforme SERCA è rappresentato dalla tapsigargina (TG). TG è estratto dalle radici della pianta *Thapsia garganica*, della famiglia delle *umbelliferae* ed è comunemente usata per la deplezione di calcio dagli accumuli intracellulari (Inesi and Sagara, 1994). TG inibisce SERCA con un rapporto stechiometrico 1:1 (TG:E2) (Young *et al.*, 2001).

I MITOCONDRI

I mitocondri sono organelli intracellulari presenti nelle cellule animali e vegetali, che svolgono la funzione di produrre l'energia necessaria per la vita della cellula in quanto rappresentano la sede della respirazione cellulare. Sono organuli generalmente a bastoncino, ma possono avere anche forma granulare o filamentosa (**Figura 8**). I mitocondri sono numerosi all'interno di una cellula ma la loro quantità può variare a seconda dei tessuti. Sono particolarmente numerosi in cellule caratterizzate da un cospicuo e continuo consumo di energia come ad esempio le cellule renali e muscolari.



Fig. 8 Foto al microscopio elettronico di un mitocondrio

Sono anche definiti organelli semiautonomi in quanto dotati di un proprio genoma, separato da quello nucleare, che consente loro di replicare, codificare e sintetizzare alcune proteine costitutive. Il DNA mitocondriale è costituito da molecole circolari organizzate in gruppi distinti nella matrice, ancorate alla membrana interna. Il DNA reca il codice genetico necessario per la sintesi di proteine che sono presenti esclusivamente all'interno del mitocondrio stesso e poiché la membrana interna è impermeabile alla maggior parte delle molecole, tali proteine non vengono mai rilasciate a livello citosolico.

I mitocondri sono soggetti a modificazioni di forma e di volume in rapporto a variazioni osmotiche e chimiche e a movimenti di spostamento nel citoplasma cellulare. Questi movimenti sono per lo più passivi, causati da correnti citoplasmatiche, ma i mitocondri sono capaci anche di movimenti attivi dovuti forse, alla presenza di proteine contrattili acto-miosino simili.

Struttura submicroscopica e funzioni

I mitocondri sono delimitati da due membrane a doppio strato lipidico selettivamente permeabili che li separano dall'ambiente citoplasmatico circostante.

La membrana esterna è liscia, mentre quella interna forma numerose invaginazioni, dette creste mitocondriali, perpendicolari alla parete e più o meno lunghe presenti in numero variabile a seconda del tipo cellulare e delle condizioni fisiologiche in cui si trova la cellula. Le due membrane racchiudono e definiscono due spazi: quello intermembrana, che si trova tra le due membrane caratterizzato dalla stessa composizione del citoplasma, e lo spazio intercrestale o matrice, dove sono presenti enzimi, coenzimi, acqua, fosfati ed altre molecole

La membrana esterna è coinvolta nei processi di *permeabilità* che consentono il passaggio a sostanze di peso molecolare inferiore ai 10.000 Da (come per esempio gli ioni).

La membrana interna, viceversa, è meno permeabile agli ioni ed è la sede di processi di *fosforilazione ossidativa*. Su di essa si trovano, infatti, gli enzimi che costituiscono la catena di trasporto degli elettroni.

A seconda della funzionalità della cellula, i mitocondri possono assumere diverse forme:

- ✓ *forma ortodossa*, quando vi è un rallentamento dell'attività ossidativa. Le creste assumono un aspetto lamellare, la camera esterna è sottile, mentre quella interna è molto ampia.
- ✓ *forma condensata*, quando l'attività fosforilativa viene stimolata. Le creste scompaiono, la camera esterna si allarga e quella interna si riduce.

Il mitocondrio nell'omeostasi del Ca^{2+} intracellulare

Il mitocondrio è caratterizzato da un potenziale di membrana di circa 180 mV, negativo all'interno, che rappresenta un elevatissimo gradiente elettrochimico per l'accumulo di Ca^{2+} . Questo potenziale porterebbe la $[\text{Ca}^{2+}]$ all'equilibrio, ad un valore di circa 0.1 M. Tale concentrazione, incompatibile con la vita di questo organello, è prevenuta dall'azione coordinata di sistemi separati di ingresso e di efflusso di Ca^{2+} , a livello della membrana mitocondriale interna.

Un sistema di *uniporto* relativamente aspecifico rappresenta la via di influsso del Ca^{2+} . Tale sistema, che può trasportare anche altri ioni bivalenti, come Sr^{2+} e Mn^{2+} , induce un rapido ingresso di Ca^{2+} a livello del mitocondrio solo a concentrazioni citoplasmatiche di quest'ultimo dell'ordine delle micromoli. Queste $[\text{Ca}^{2+}]$ sono raggiunte a livello dei siti di contatto tra mitocondri e reticolo endoplasmatico in seguito alla formazione di microdomini ad alta $[\text{Ca}^{2+}]$ a livello dei recettori di InsP3 (Rizzuto *et al.*, 1993).

Le vie di efflusso del Ca^{2+} sono elettroneutre e sono rappresentate da: *antiporto $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$* e *antiporto $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$* . Tramite il primo sistema, stimolato da valori elevati del potenziale di membrana, vengono trasportati 2 ioni H^+ contro uno ione Ca^{2+} (Bernardi and Azzone, 1983). Il secondo è uno scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, in grado di estrarre Ca^{2+} scambiandolo con Na^+ secondo un rapporto stechiometrico $2 \text{Na}^+ : 1 \text{Ca}^{2+}$. Il Na^+ che si accumula all'interno della matrice viene espulso nuovamente dall'antiporto H^+/Na^+ (che scambia 1

Na^+ per 1 H^+). Questi due sistemi (H^+/Na^+ e $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) complessivamente portano all'estrusione di Ca^{2+} e la loro combinazione costituisce la via di efflusso del Ca^{2+} più importante a livello dei tessuti eccitabili. E' noto inoltre che l'espulsione del Ca^{2+} può essere modulata dal potenziale di membrana con un meccanismo per ora sconosciuto.

Il mitocondrio nel processo apoptotico

L'apoptosi può essere indotta anche da stimoli che non coinvolgono i recettori citotossici o la formazione di ceramide. Farmaci ad attività citotossica (es. chemioterapici), radiazioni ionizzanti, *shock* termico, sottrazione di fattori di crescita o sopravvivenza e altri *stress* cellulari, sono tutti esempi di questo tipo.

Gli eventi intracellulari ed i *pathways* evocati da tali stimoli all'interno della cellula possono essere diversi, ma il più delle volte convergono su pochi bersagli. Tra questi, un ruolo di primo piano è svolto dai mitocondri (Kluck *et al.*, 1997) che attivano la cosiddetta "via mitocondriale" dell'apoptosi.

Il processo apoptotico richiede energia e in alcuni casi, anche la sintesi di proteine. Oltre a giocare un ruolo fondamentale nella produzione di energia, i mitocondri partecipano attivamente all'apoptosi. Durante il processo apoptotico, vanno incontro ad una permeabilizzazione selettiva della membrana mitocondriale esterna permettendo il rilascio di diversi fattori proteici che, normalmente, sono confinati nello spazio intermembrana, come il citocromo c, AIF e Smac/DIABLO.

Soltanto di recente è stato scoperto il ruolo proapoptotico del cit c, oltre a quello ben noto di catalizzatore del trasferimento di elettroni tra i complessi III e IV della catena respiratoria.

Durante il processo apoptotico questa molecola trasloca, dallo spazio intermembrana dei mitocondri al citoplasma (Kluck *et al.*, 1997) formando un complesso con Apaf-1, procaspasi-9, dATP (deossiATP) denominato *apoptosoma* (**Figura 9**).

La flavoproteina AIF è una ossidoreduttasi prodotta a livello citoplasmatico che trasloca nello spazio intermembrana del mitocondrio. Durante l'apoptosi, AIF viene rilasciato dall'organulo e migra al nucleo dove induce condensazione della cromatina e frammentazione del DNA. Nello spazio intermembrana è presente un ulteriore fattore proapoptotico. Si tratta di Smac/DIABLO che viene rilasciato durante l'apoptosi e che lega l'inibitore dell'apoptosi IAPs inattivandolo, permettendo così, l'aggregazione di Apaf-1 con la procaspasi-9.

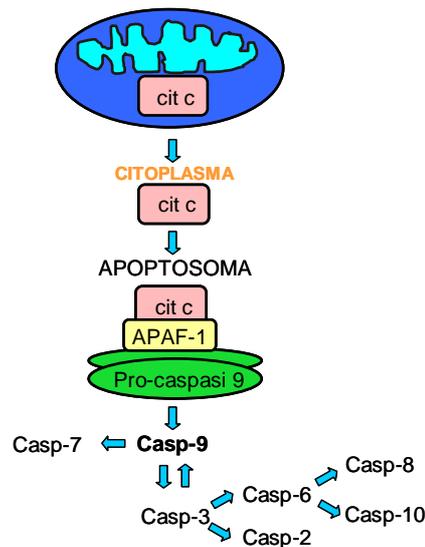


Fig. 9 *Formazione dell' apoptosoma. Apaf-1 promuove l'attivazione della caspasi-9 mediante oligomerizzazione. Il citocromo c e l'ATP regolano la capacità di Apaf-1 di reclutare la caspasi-9.*

Questi cofattori delle caspasi vengono rilasciati grazie a complessi multiproteici non del tutto caratterizzati. Tra questi, VDAC (*voltage dependent anion channel*) che forma complessi con il trasportatore di nucleotidi adeninici e PTP (*permeability transition pore*) (Kroemer and Reed, 2000), un complesso che originerebbe pori mitocondriali la cui apertura sarebbe regolata da proteine della famiglia di Bcl-2, oltre che dall'ADP e da diversi ioni, come Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ . L'apertura di tali pori porterebbe al collasso del potenziale mitocondriale e al rilascio del cit c. Vi sono comunque indicazioni che mostrano

come il rilascio di cit c e di altri fattori proapoptotici possa avvenire anche prima e indipendentemente dal collasso del potenziale mitocondriale.

Le proteine della famiglia di Bcl-2

I mitocondri sono sede di diverse proteine della famiglia di *Bcl-2* (*B-cell lymphoma-2 gene*), un gene antiapoptotico identificato per la prima volta in linfomi umani a cellule B, che rappresenta la controparte di *ced-9* nei vertebrati. Bcl-2 è il rappresentante di una famiglia di proteine dotate sia di attività pro-apoptotica (Bax, Bad, Bak, Bid, Bik, Bcl-x_s), sia anti-apoptotica (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, A1). Il rapporto relativo tra le proteine dei due gruppi determinerebbe la suscettibilità o meno della cellula ad andare in apoptosi. Tutti i membri della famiglia di Bcl-2 sono in grado di localizzarsi a livello della membrana e per alcuni è stata dimostrata la capacità di formare canali ionici (Gross *et al.*, 1999; Schendel *et al.*, 1998).

Queste proteine sono caratterizzate da un massimo di quattro domini con struttura ad α -elica e forti omologie di sequenza: BH1, BH2, BH3, BH4. La maggior parte dei membri antiapoptotici conserva tutti e quattro i domini, mentre la struttura di quelli proapoptotici frequentemente non presenta il dominio BH4. Sembra inoltre, che il dominio BH3 sia indispensabile nella induzione dell'apoptosi; questa ipotesi trova conferma da studi di mutagenesi e di delezione e nell'individuazione di un'ulteriore sottofamiglia composta da proteine proapoptotiche che presentano analogie di sequenza solo nel dominio BH3.

Studi sulla struttura tridimensionale della proteina antiapoptotica Bcl-x_L hanno evidenziato la presenza di sette α -eliche separate da anse flessibili; anche Bcl-2 e Bax possiedono regioni ad α -elica disposte in modo simile. Inoltre tutte e tre le proteine sono in grado di formare *in vitro* canali ionici nelle membrane che però, presentano rilevanti differenze. In

generale Bcl-x_L e Bcl-2 formano canali caratterizzati da una bassa conduttanza e da una modesta selettività per i cationi, mentre quelli formati in vitro da Bax hanno una conduttanza 100-1000 volte maggiore, preferiscono anioni e permangono per più tempo nello stato aperto.

Queste tre proteine, inoltre, presentano forti analogie strutturali con i domini formanti pori di alcune tossine batteriche, come per esempio quella della difterite. Confrontando le strutture di queste proteine e delle tossine batteriche si è ipotizzato che alla formazione dei canali partecipino le α -eliche $\alpha 5$ e $\alpha 6$ (Reed, 1997).

Bid è un fattore proapoptotico della famiglia di Bcl-2 che possiede un sito di taglio per la casp-8 che lo taglia in tre frammenti: p11, p13, e p15; quest'ultimo (tBid) oltre a traslocare nei mitocondri ed essere responsabile del rilascio del cit c, induce l'oligomerizzazione di Bax ed il suo inserimento nella membrana esterna dei mitocondri.

Anche un altro membro della sottofamiglia, Bad, possiede un solo dominio BH3. La sua attività è regolata da chinasi e fosfatasi. Quando gli stimoli di sopravvivenza vengono a mancare, la molecola subisce una defosforilazione e trasloca nella membrana esterna dei mitocondri formando eterodimeri con Bcl-x_L e promuovendo l'apoptosi.

GFP: LA PROTEINA A FLUORESCENZA VERDE

GFP è una proteina fluorescente scoperta nel 1961 da Osamu Shimomura e isolata dalla medusa *Aequorea victoria* (Brooks, 2005) (**Figura 10**). Il gene *gfp* è stato clonato nel 1994 e la proteina ha immediatamente suscitato l'interesse della comunità scientifica per possibili applicazioni in ambito molecolare e farmacologico (Chudakov *et al.*, 2005).

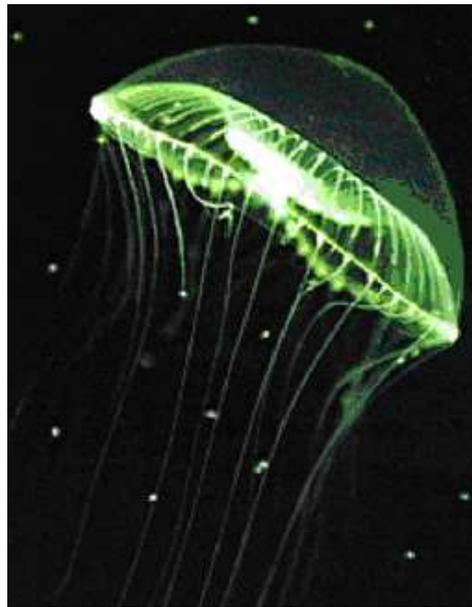


Fig. 10 *La medusa Aequorea victoria*

GFP è costituita da un'unica catena polipeptidica di 238 aa avente un peso molecolare in soluzione di circa 27-30 kDa (**Figura 11**). E' espressa da celenterati che comprendono Idrozoi (*Aequorea*, *Obelia* e *Phialidium*) e Antozoi (*Renilla*), ma solo le forme di GFP di *Aequorea* e *Renilla* sono state ben caratterizzate dal punto di vista biochimico. Molte specie bioluminescenti posseggono proteine accessorie che emettono fluorescenza i cui cromofori necessitano di cofattori esterni (es. flavine), per contro, GFP non richiede cofattori (ad eccezione dell'ossigeno) e può essere impiegato come fluoroforo funzionale di ampio utilizzo (Chudakov *et al.*, 2005).

Le applicazioni della GFP sono molteplici, infatti è un mezzo importante per investigare, attraverso analisi microscopica, un'ampia gamma di eventi biologici come le modificazioni morfo-funzionali a livello degli organelli intracellulari, l'espressione genica, la proliferazione.

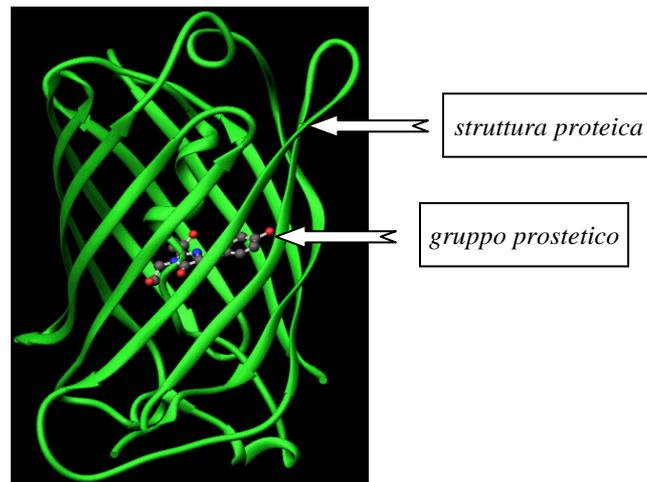


Fig. 11 Rappresentazione tridimensionale della struttura di green fluorescent protein (GFP)

GFP è formata da una catena polipeptidica di 238 aa e da un gruppo prostetico (celenterazina) che, in presenza di ioni Ca^{2+} , si distacca come derivato amminico emettendo luce blu. L'energia prodotta viene trasferita a GFP che raggiunge uno stato eccitato. Il ritorno allo stato basale causa l'emissione di luce verde.

In natura il colore verde emesso dalla GFP è il prodotto di un fenomeno, detto *energy transfer*, che implica l'interazione con l'equorina, una seconda fotoproteina sintetizzata da *A. victoria*. GFP ha un gruppo prostetico, la celenterazina, che in presenza di ioni Ca^{2+} , si distacca sotto forma di derivato ammidico con conseguente emissione di luce blu. L'energia sviluppata è trasferita alla GFP, che a sua volta passa ad uno stato eccitato da cui decade emettendo luce verde. Ciò può essere sfruttato in laboratorio eccitando la GFP con luce blu per ottenere fluorescenza verde.

Le caratteristiche spettrali della GFP dipendono da un gruppo cromoforo costituito da sei aminoacidi (Phe-Ser-Tyr-Gly-Val-Glu), legato ad essa in modo covalente (**Figura 12**). La ciclizzazione di questi aa porta alla formazione di un anello imidazolico attraverso il legame tra il carbonio carbossilico della serina e il gruppo amminico della glicina (Prasher *et al.*, 1992).

Il cromoforo mantiene la sua funzionalità anche se sottoposto a bruschi trattamenti come variazioni di pH e variazioni di colore, ma è sensibile ai processi ossidativi: in presenza di ossigeno la forma ossidata di GFP è fluorescente, mentre la forma ridotta non emette luce (Inouye and Tsuji, 1994). GFP mantiene la fluorescenza a pH compreso tra i valori 5.5 e 12, è resistente al calore (70°C), all'uso di detergenti, solventi organici, e all'azione di proteasi; inoltre GFP è stabile in molti organismi.

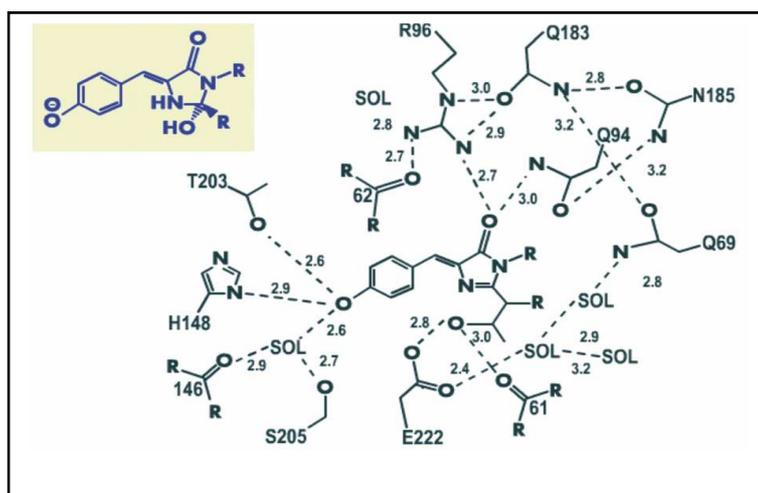


Fig. 12 *Struttura della proteina GFP*

Nello spettro di fluorescenza della GFP nativa, la curva d'eccitazione presenta due picchi: un picco massimo a 395 nm e un picco d'intensità inferiore a 478 nm. Lo spettro d'emissione invece, presenta il picco di massima intensità fluorescente a 509 nm e una leggera spalla a 545 nm.

Eccitando la proteina ad una lunghezza d'onda di 395 nm si ottiene una rapida diminuzione della fluorescenza (*photobleaching*). Si preferisce dunque lavorare ad una diversa lunghezza d'onda, con luce a 478 nm, per avere un'emissione di luce fluorescente più stabile e duratura nel tempo. Introducendo mutazioni nella sequenza nucleotidica, possono essere create GFP che presentano oltre ad una diversa struttura aminoacidica anche proprietà spettrali molto diverse da quelle della GFP nativa. I prodotti di mutagenesi della GFP sono raggruppati in due classi principali:

- ✓ ***GFP “ottimizzate” (EGFP)***, che sono proteine con un'elevata efficienza di espressione. In questo modo viene aumentata la stabilità della proteina e/o l'intensità della luce emessa dopo eccitazione con luce visibile. Un esempio è il mutante S65T. Nella S65T la serina in posizione 65 è stata sostituita da una treonina. Lo spettro mostra un picco d'eccitazione a 489 nm, d'intensità maggiore rispetto a quello della proteina nativa, ed un aumento dell'intensità di emissione di luce di circa sei volte senza alterazione lo spettro d'emissione.

- ✓ ***GFP con varianti spettrali***, ovvero quelle che conferiscono alla GFP diversi colori che possono essere chiaramente distinti dal colore verde della GFP nativa. Questa classe include i mutanti più comunemente usati come BluFP (Y66H/Y145F), YellowFP (T203Y) e CyanFP (Y66W).

AEQUORINA

L'aequorina è una fotoproteina purificata ed analizzata per la prima volta all'inizio degli anni '60 dalla medusa luminescente *Aequorea victoria* (Shimomura *et al.*, 1962).

Tale fotoproteina è costituita da una porzione proteica di 189 aa e da un gruppo prostetico idrofobico, la celenterazina, per un peso totale di circa 22 kD.

La capacità di emettere luminescenza è correlata alla presenza della celenterazina unita covalentemente alla porzione proteica mediante un legame perossidico. A seguito del legame con il calcio, la rottura irreversibile di tale legame determina l'emissione di fotoni, oltre alla liberazione della celenterazina in forma di derivato amidico (celenteramide) e della apoproteina inattiva (**Figura 13**). La fotoproteina attiva può essere riottenuta incubando l'apoproteina in presenza di celenterazina in ambiente riducente (Blinks *et al.*, 1978).

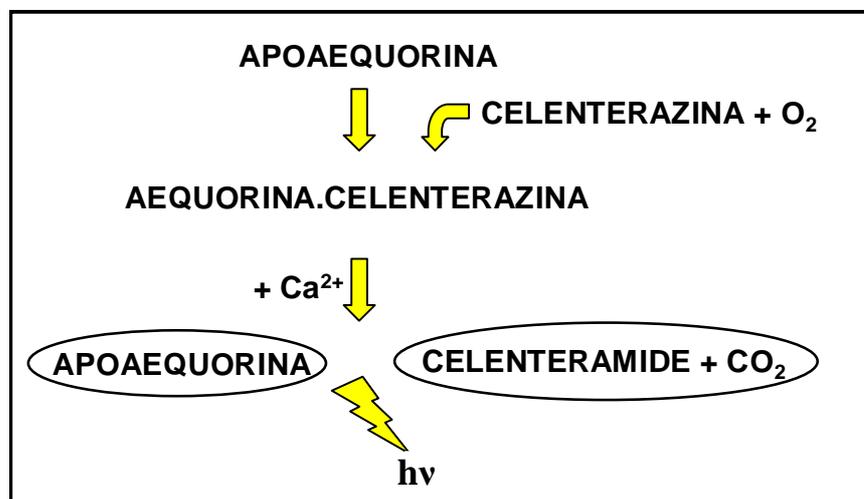


Fig. 13 Rappresentazione schematica del passaggio da apoaequorina a aequorina

L'aequorina possiede tre siti di legame per il calcio *EF-hand*, gli stessi presenti nella calmodulina e nella parvalbumina. Il legame con il calcio determina una modificazione

conformazionale ed una conseguente ossidazione intramolecolare della celenterazina con liberazione di fotoni.

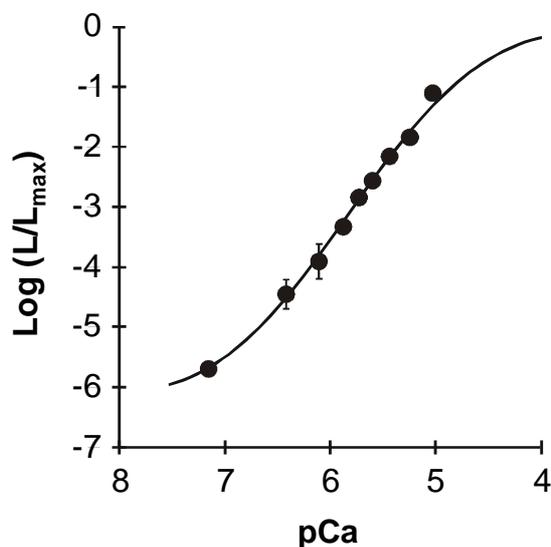


Fig. 13 Curva di calibrazione dell'aequorina

Poiché la forma nativa dell'aequorina è utile in compartimenti con $[Ca^{2+}]$ comprese tra 0.1 e 10 μM , come il citoplasma, mentre l'esposizione a concentrazioni più elevate causa un immediato consumo della fotoproteina, l'affinità dell'aequorina per il calcio viene ridotta con due metodologie:

1. ***Aequorina mutata***: permette di misurare $[Ca^{2+}]$ comprese tra 10 e 100 μM (Kendall *et al.*, 1992). Deriva dalla sostituzione di un residuo di acido aspartico in posizione 119 con l'aminoacido alanina. La mutazione rende inattivo uno dei tre siti leganti il calcio e, di conseguenza, questa fotoproteina si differenzia dalla nativa per un'affinità per lo ione venti volte minore.

2. ***Celenterazina mutata***: dotata di ridotta affinità per l'aequorina. Il suo uso combinato a quello dell'aequorina mutata permette di misurare $[Ca^{2+}]$ superiori a 100 μM .

La velocità di emissione dei fotoni da parte dell'aequorina può essere convertita in $[Ca^{2+}]$.

Aequorina mitocondriale

L'aequorina mitocondriale (mtAEQ) utilizzata per i nostri esperimenti si ottiene aggiungendo una presequenza mitocondriale in posizione N-terminale. Il cDNA della citocromo c ossidasi umana (Rizzuto *et al.*, 1992) è stato digerito con gli enzimi di restrizione HindIII e EcoRI, ottenendo un frammento che codifica il segnale di localizzazione mitocondriale ed i primi sei aminoacidi del polipeptide maturo. La digestione sul cDNA dell'aequorina libera un frammento che si estende dall'inizio della porzione codificante, escluso il primo aminoacido, fino alla regione non codificante in 3', incluso il sito di poliadenilazione. Le due sequenze codificanti sono state fuse insieme e clonate in un vettore di espressione. La sequenza del cDNA chimerico è stata, successivamente, verificata per sequenziamento.

Aequorina del reticolo endoplasmatico

Come ho già accennato, allo scopo di effettuare misurazioni tramite l'uso dell'aequorina in compartimenti ad alta concentrazione di Ca^{2+} , è stata prodotta una modificazione della sequenza per l'aequorina che rende inattivo uno dei tre siti di legame del Ca^{2+} ; inoltre è stato sostituito il gruppo prostetico celenterazina con un analogo modificato, la celenterazina n, con una minore affinità per il Ca^{2+} : la combinazione di queste due modifiche, aequorina e celenterazina a bassa affinità, ha permesso la misura in compartimenti con $[\text{Ca}^{2+}]$ più elevate di 100 μM .

I principali svantaggi dell'uso dell'aequorina traggono origine dai limiti della reazione chemioluminescente: dall'osservazione della curva dose-risposta si può notare infatti, che per $[\text{Ca}^{2+}]$ inferiori a 10^{-7} M esiste comunque un certo tasso di consumo Ca^{2+} -indipendente dell'aequorina, così come a concentrazioni di Ca^{2+} superiori a 10^{-5} M si ha saturazione.

Queste caratteristiche rendono la fotoproteina poco accurata nel misurare $[Ca^{2+}]$ presenti nel citoplasma in assenza di stimolazione e pongono delle limitazioni al suo utilizzo in compartimenti subcellulari ad alta $[Ca^{2+}]$. E' tuttavia possibile estendere l'applicazione dell'aequorina utilizzando gruppi prostetici di sintesi che ne modifichino l'affinità per il Ca^{2+} o introducendo mutazioni che diminuiscano il numero di siti di legame per il Ca^{2+} (come visto per il RE e per i mitocondri). Infine, una limitazione importante nell'utilizzo dell'aequorina è rappresentata dalla difficoltà di seguire l'emissione di luminescenza in singola cellula perché il numero di fotoni emessi è troppo basso per poter essere rilevato dagli attuali sistemi di misura.

REAGENTI E MATERIALI

Reagenti

I terreni DMEM e DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) sono stati acquistati rispettivamente presso le ditte Euroclone (Celbio, Milano, Italia) e Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

FCS (siero fetale bovino) dalla ditta Life Technologies (Milano, Italia).

ATP e kit Cell Death Detection ELISA^{PLUS} sono stati acquistati presso la ditta Roche (Milano, Italia), mentre apirasi VI grado, oATP (ATP ossidato), BzATP (2',3'-(4-benzoil)-benzoil-ATP), FCCP (carbonil cianide α -[3-(2-benzotiazolil)6-[2-[2-bis(carbossimrtil)amino]-5-metilfenossi]-2-oxo-2H-1-benzopiran-7yl]-b-(carbossimetil) tetrapotassio), tapsigargina, carbacolo, tBHQ (terbutil idrochinone) e staurosporina presso Sigma-Aldrich (Milano, Italia); il TMRM (*tetramethylrhodamine methyl ester*), celenterazina e Fura-2/AM dalla Molecular Probes (Leiden, Olanda). Il *buffer* di lisi e di diluizione per gli esperimenti di misurazione della concentrazione di ATP intracellulare ed il *kit* luciferina-luciferasi sono della ditta FireZyme (San Diego, CA, USA), mentre l'antibiotico G418 solfato (geneticina) della Calbiochem (La Jolla, CA, USA).

Gli esperimenti, dove indicato, sono stati effettuati incubando le cellule in una soluzione salina contenente 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES, 5.5 mM glucosio, 5 mM NaHCO₃, 1 mM CaCl₂ (pH 7.4 con NaOH) (*soluzione salina standard*).

I plasmidi per l'espressione delle proteine chimeriche erGFP, mtGFP, erAEQ e mtAEQ sono stati prodotti nel laboratorio del professor Rosario Rizzuto (Università di Ferrara, Italia).

Materiali

I materiali utilizzati per gli esperimenti sono stati acquistati presso le seguenti ditte:

le fiasche sterili (75 cm²) da Falcon (Franklin Lakes, NJ, USA);

le piastre (50 mm di diametro) da Sterilin (Staffs, Gran Bretagna);

i vetrini (24 mm e 40 mm di diametro) da BDH (Milano, Italia);

le pipette (5-10 ml) da Sarstedt (Numbrecht, Francia).

METODI

Modelli cellulari e relativa tecnica di coltura

Le linee cellulari utilizzate per gli esperimenti sono HEK293 (cellule di rene embrionale umano) e HeLa (cellule di neoplasia della cervice uterina).

Le cellule HEK293 e HeLa sono state coltivate rispettivamente in terreno DMEM-F12 e DMEM addizionati con 10% di siero fetale bovino (FCS), 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina, a pH 7,4. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni due giorni allo scopo di evitare una acidificazione eccessiva.

I cloni stabili HEK293 esprimenti il recettore umano P2X₇R sono stati mantenuti in presenza di 0.2 mg/ml di G418 solfato (geneticina) al fine di mantenere in selezione le cellule esprimenti il recettore.

Raggiunta la confluenza, le cellule sono state staccate dalle fiasche utilizzando pipette *pasteurs* di vetro sterili (HEK293) o tripsina diluita in PBS 1:5 (HeLa).

Le cellule sono state coltivate in fiasche da 75 cm² e mantenute in incubatore Haereus a 37°C, in atmosfera satura di umidità e in presenza di 5% CO₂.

Preparazione di batteri *E. coli* competenti

Per l'ottenimento dei plasmidi da utilizzare per la transfezione in cellule eucariotiche sono stati utilizzati vari ceppi di *E. coli* (DH5α, TOP10, XL1Blue) resi competenti come segue.

500 ml di terreno di Luria-Bertani (LB, 1% NaCl, 1% Bacto tripone, 0.5% Yeast extract) sono stati inoculati con una singola colonia di cellule del ceppo DH5α, prelevata da una piastra LB agar (1.5% Bacto agar) ed incubati per tutta la notte sotto agitazione a 37°C.

Quando la sospensione cellulare ha raggiunto una densità ottica di 0.45-0.55 OD a 600 nm, è stata raffreddata in ghiaccio per 30 minuti. Le cellule sono state quindi centrifugate per 15 minuti a 2500 x g ed il surnatante rimosso. Il precipitato è stato risospeso in 500 ml di CaCl₂ 100 mM sterile, raffreddato in ghiaccio. Dopo incubazione in ghiaccio per 45 minuti, la sospensione batterica è stata lavata e risospesa in 25 ml di CaCl₂ 100 mM sterile. E' stato poi aggiunto egual volume di una soluzione 100 mM CaCl₂, 30% glicerolo, sterile. Le cellule, così preparate, sono state aliquotate e conservate a -80°C.

Trasformazione chimica

Le cellule preparate come descritto sopra sono state utilizzate per la trasformazione chimica con il vettore PCDNA3 contenente i geni per diverse proteine (hP2X₇, mtAEQ, erAEQ, mtGFP, erGFP). Il plasmide utilizzato è PCDNA3 contenente il cDNA delle diverse proteine. Dopo l'aggiunta di circa 100 ng di DNA plasmidico ad un'aliquota di 200 µl di cellule *E. coli* DH5α, è seguita una incubazione in ghiaccio per 30 minuti ed uno shock termico a 37°C per 3 minuti. Dopo 10 minuti in ghiaccio, alla miscela è stato aggiunto 1 ml di LB ed il tutto è stato incubato per 45 minuti a 37°C. I batteri sono stati dunque centrifugati per 3 minuti a 16750 x g, il surnatante rimosso e le cellule risospese in circa 100 µl di LB. Si è proceduto a piastrare su piastre LB agar con ampicillina (100 µg/ml) e si è incubato per tutta la notte a 37°C.

Isolamento del DNA plasmidico da batteri

Una singola colonia batterica è stata inoculata in 2 ml di LB ampicillina ed incubata sotto in agitazione per circa 4-5 ore a 37°C. Questa sospensione batterica è stata utilizzata come preinoculo per un volume di 200-500 ml di LB ampicillina, che è stato poi incubato per tutta la notte a 37°C in agitazione.

La mattina seguente, le cellule sono state separate per centrifugazione a 6500 rpm (rotore SS34, centrifuga Sorvall) e si è proceduto all'estrazione del DNA utilizzando il *kit* della ditta Quiagen (Milano, Italia). Il *pellet* cellulare è stato risospeso prima, in 10 ml di *Resuspension Buffer* (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A) poi, in 10 ml di *Lysis Buffer* (200 mM NaOH, 1% SDS). E' seguita una incubazione in ghiaccio per 5 minuti, una aggiunta di 10 ml di *Neutralization Buffer* (3 M acetato di potassio, pH 5.5), ed un'ulteriore incubazione in ghiaccio per 15-20 minuti. Dopo una centrifuga a 12.000 rpm per 30 minuti a 4°C per recuperare il surnatante, è stata equilibrata la colonnina che permette la separazione del DNA applicando 10 ml di *Equilibration Buffer* (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanolo). Il surnatante batterico contenente il DNA è stato fatto passare attraverso la colonnina, ricca di cariche positive in grado di legare il DNA stesso. Poi, al fine di separare il solo DNA, la colonna è stata lavata con un buffer apposito. Per eluire il DNA si è quindi proceduto all'applicazione di un buffer a pH basico. Al DNA estratto sono stati aggiunti 12 ml di isopropanolo (a temperatura ambiente) per permetterne la precipitazione. Successivamente, il pellet di DNA è stato lavato con 5 ml di etanolo al 70%, centrifugato a 12.000 rpm per 10 minuti, fatto asciugare all'aria per 5-10 minuti e risospeso in 200 µl di tampone TE (10 mM Tris-Cl, pH 8; 1 mM EDTA). La concentrazione del plasmide è stata determinata misurando l'assorbanza a 260 nm di una diluizione della soluzione.

Transfezione transiente con $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

Le cellule HEK293 sono state transfettate con diversi cDNA. Sono state seminate su vetrini di 40 o 15 mm di diametro precedentemente polilisinati, in modo che raggiungessero il 70% di confluenza dopo 24 ore. In una *ependorf* sterile sono stati aggiunti in successione, per ciascun vetrino: TE 1x, 12.5 mM CaCl_2 e 8 µg/ml cDNA. In

agitazione, sotto cappa sterile, il contenuto della *eppendorf* è stato aggiunto, goccia a goccia, ad un uguale volume di tampone HBS 2x (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.12), allo scopo di ottenere un fine precipitato di Ca₃(PO₄)₂. E' seguita un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente. La soluzione di DNA precipitato è stata aggiunta successivamente alle cellule, direttamente nel mezzo di coltura. Dopo un'incubazione di 12 ore, sono seguiti 4 lavaggi con PBS al fine di eliminare il precipitato non endocitato. Gli esperimenti sono stati eseguiti a 36 ore dalla trasfezione.

Misurazione della variazione della concentrazione di calcio citoplasmatico

Le modificazioni della concentrazione di calcio citoplasmatico sono state misurate mediante l'indicatore fluorescente fura-2/AM (Molecular Probes), utilizzando un fluorimetro LS50 Perkin Elmer (Perkin Elmer Ltd., Beaconsfield, UK).

Fura-2 è un derivato benzofuranico simile all'EGTA, in grado di legare calcio con un rapporto stechiometrico 1:1 e con una K_d di 224 nM (costante misurata in una soluzione che riproduce le condizioni ioniche intracellulari).

Fura-2 è una molecola idrofilica, non lipodiffusibile, che non permea attraverso una membrana plasmatica intatta. Il passaggio all'interno della cellula è reso possibile dal mascheramento dei cinque gruppi carbossilici con altrettanti residui acetossimetilesteri che trasforma la molecola di fura-2 nel suo derivato esterificato (fura-2/AM). In seguito, questi gruppi acetossimetilestere vengono idrolizzati da esterasi citosoliche che, ristabilendo la forma pentacarbossilata, impediscono alla molecola di diffondere ulteriormente attraverso le membrane.

Per verificare la concentrazione intracellulare di Ca²⁺, 1 x 10⁶/ml cellule sono state incubate per 15 minuti in soluzione salina a 37°C, in presenza di 0,5 µM fura-2/AM e di 250 µM sulfinpirazone (SP). Quest'ultimo è un inibitore dei trasportatori degli anioni

organici presenti nella cellula che impedisce l'estrusione di fura-2/AM nell'ambiente extracellulare. Dopo un lavaggio per eliminare il fura extracellulare, le cellule sono state poste in una cuvetta di vetro ottico termostata provvista di agitatore magnetico.

Si sono utilizzate le lunghezze d'onda di eccitazione di 340 e 380 nm e di emissione di 505 nm. Per verificare l'avvenuto intrappolamento di fura-2/AM nella cellula, al termine dell'esperimento è stata aggiunta 100 nM ionomicina, un Ca^{2+} ionoforo che consente l'ingresso massivo di Ca^{2+} nella cellula facendo aumentare notevolmente il segnale di fluorescenza se la cellula contiene fura.

La concentrazione di calcio si ricava dal rapporto tra le intensità di fluorescenza del fura-2, a 340 nm e 380 nm, secondo l'equazione:

$$[\text{Ca}^{2+}]_c = K_d \times (R - R_{\min} / R_{\max} - R) \times \beta \quad \text{con } \beta = S_{f_2} / S_{b_2}$$

dove:

K_d costante di dissociazione del complesso Ca^{2+} -fura-2 equivalente a 224 nm a 37°C, 1 mM Mg^{2+} , pH 7.05.

R rapporto dell'intensità di fluorescenza alle due lunghezze d'onda;

R_{\min} rapporto dell'intensità di fluorescenza alle due lunghezze d'onda a concentrazione di Ca^{2+} virtualmente uguale a 0;

R_{\max} rapporto dell'intensità di fluorescenza alle due lunghezze d'onda a concentrazione di Ca^{2+} saturante;

S_{f_2} e S_{b_2} intensità di fluorescenza alla λ_2 misurate a concentrazione di Ca^{2+} virtualmente 0 e saturante, rispettivamente.

β è un coefficiente di proporzionalità che tiene conto dell'efficienza quantica del cromoforo e della capacità dello strumento di rilevare i fotoni emessi. La calibrazione non

richiede la lisi cellulare: i valori R_{\min} , R_{\max} e β possono essere calcolati *off line* e mantengono la loro applicabilità se non vengono modificate le condizioni strumentali.

Misurazione della variazione della concentrazione di calcio mitocondriale

Per la misurazione della concentrazione del calcio mitocondriale (mtAEQ) e reticolare (erAEQ) è stata utilizzata la fotoproteina aequorina (Rizzuto *et al.*, 1993).

Trentasei ore dopo la trasfezione con 4 $\mu\text{g/ml}$ mtAEQ, le cellule sono state incubate 1-2 ore con 5 μM celenterazina nella seguente soluzione salina: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgSO_4 , 20 mM HEPES e 5.5 mM glucosio a pH 7.4.

Le cellule sono state piastrate su vetrini di 13 mm alla densità di $1 \times 10^5/\text{ml}$ e poste in una camera di perfusione (diametro 15 mm, altezza 2 mm, volume totale 200 μl), che si trova a diretto contatto con un fotomoltiplicatore. La camera è termostata a 37°C e perfusa mediante pompa peristaltica Gilson Minipuls3 (Milano, Italia). Il segnale di uscita dell'amplificatore-discriminatore è raccolto da un contatore di fotoni Thorn EMI C660 (Middlesex, Gran Bretagna) ed inviato ad un computer IBM-compatibile che registrando in memoria ne permette l'analisi successiva.

Tramite un sistema di tubi le cellule vengono perfuse con le soluzioni desiderate e, momento dopo momento, i fotoni emessi dall'aequorina in risposta alle variazioni della $[\text{Ca}^{2+}]$ intracellulare sono raccolti e convertiti dal fototubo in segnali elettrici. Questi vengono successivamente elaborati da un computer mediante l'utilizzo di un programma che permette la conversione della quantità di luce emessa in base alla curva di risposta del calcio alla fotoproteina (Denton and McCormack, 1980, Rizzuto *et al.*, 1995).

Per gli esperimenti con mtAEQ, le cellule sono state perfuse con la soluzione salina sopra citata addizionata di 100-500 μM carbacolo o 3 mM ATP.

Allo scopo di conoscere il contenuto totale di aequorina, al termine di ogni esperimento le cellule vengono perfuse con una soluzione contenente 100 μM digitonina e 10 mM CaCl_2 . La digitonina è un detergente che causa la disaggregazione delle membrane cellulari permettendo così, al calcio di entrare all'interno della cellula e consumare in poco tempo tutta l'aequorina rimasta.

Misurazione della concentrazione di calcio del reticolo endoplasmatico

Trentasei ore dopo la transfezione con 4 $\mu\text{g/ml}$ erAEQ le cellule sono state lavate con la salina precedentemente descritta addizionata con 600 μM EGTA (chelante del calcio) e incubate con 50 μM terbutil idrochinone (TBHQ) (inibitore reversibile delle pompe SERCA presenti sulla membrana del reticolo endoplasmatico) per 10 min a temperatura ambiente, al fine di permettere la completa fuoriuscita del calcio contenuto nel RE. A seguito di due lavaggi con salina addizionata di 600 μM EGTA, le cellule sono state incubate 45 minuti a temperatura ambiente con salina contenente 5 μM celenterazina e 30 μM TBHQ. All'interno del luminometro, le cellule sono state successivamente perfuse con la salina contenente 1 mM Ca^{2+} ed è stata misurata l'intensità di luminescenza rilasciata dall'aequorina.

Microscopia confocale e misurazione delle variazioni del potenziale di membrana mitocondriale

Per la misurazione del potenziale di membrana mitocondriale delle cellule HEK293 e HeLa è stato utilizzato un microscopio confocale Zeiss LSM 510 (Zeiss, Gottingen, Germania) dotato di obiettivo ad immersione 63x.

In questi ultimi anni, la microscopia confocale a scansione *laser* si è affermata come una potente tecnologia in grado di migliorare la qualità delle osservazioni in microscopia ottica

nonché di aprire nuove possibilità di indagine e nuove applicazioni in campi assai vari della ricerca scientifica.

Un microscopio confocale si differenzia strutturalmente da un tradizionale microscopio a fluorescenza per l'utilizzo di una sorgente luminosa *laser* (che consente di migliorare drasticamente la qualità delle immagini grazie all'intensità e alla coerenza della luce emessa) e per la presenza di un sistema ottico ed elettronico che permette di effettuare la scansione di una sezione del campione osservato (sezione ottica), ricostruendo poi sullo schermo di un *computer* l'immagine risultante.

La lunghezza d'onda di emissione del *laser* utilizzata per gli esperimenti è 543 nm. Tutte le immagini sono state ottenute utilizzando il *software* LSM (Carl Zeiss, Arese, Italia) e l'emissione di fluorescenza è stata successivamente quantificata mediante il *software* Metamorph 2.3 (Universal Imaging, Downingtown, PA).

Le cellule HEK293 ed HeLa sono state seminate su vetrini sterili di 24 mm di diametro e dopo 24 ore, trattate per 30 minuti a 37°C con 20 nM TMRM in una soluzione salina avente la seguente composizione: 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES, 5.5 mM glucosio, 5 mM NaHCO₃, 1 mM CaCl₂, pH 7.4 al fine di misurare il potenziale di membrana mitocondriale.

La misurazione dell'emissione di fluorescenza a seguito della stimolazione con ATP è stata misurata nelle cellule mantenute nella medesima salina.

Il TMRM è un marcatore fluorescente di membrana sensibile al potenziale che alla bassa concentrazione di 20 nM, si localizza nei mitocondri e a seguito della depolarizzazione di questi organelli diffonde nel citosol. Le misure del potenziale sono state corrette con la fluorescenza residua di TMRM dopo il totale collasso del potenziale di membrana causato dal disaccoppiante mitocondriale FCCP (Duchen *et al.*, 2003).

L'acquisizione dei dati è stata effettuata su 10-15 cellule per vetrino ed in media sono stati analizzati 10 vetrini per ogni condizione sperimentale.

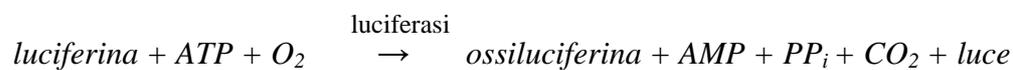
Le immagini sono state ottenute prima e dopo la stimolazione con differenti agonisti ogni 3 minuti per 30 minuti totali.

Misurazione di ATP

La misura della concentrazione di ATP intracellulare è stata effettuata utilizzando il metodo della luciferina-luciferasi, sfruttando il fenomeno della luminescenza (emissione di una radiazione elettromagnetica nel visibile come risultato di una reazione chimica).

L'enzima luciferasi richiede ATP per scindere la luciferina ed in presenza di un eccesso di quest'ultima permette di determinare un'emissione di luce proporzionale alla quantità di ATP prodotto dalle cellule.

La luciferasi di lucciola catalizza, in presenza di ATP, l'ossidazione della luciferina:



La luce emessa è stata registrata da un luminometro (FireZyme, San Diego, CA, USA) collegato ad un amplificatore di corrente continua avente un ampio intervallo di sensibilità ed una risposta lineare.

L'esperimento è stato effettuato utilizzando il *kit* luciferina-luciferasi acquistato presso la FireZyme. Tale *kit* contiene: la soluzione luciferina-luciferasi, un tampone stabilizzante l'ATP, un tampone di lisi cellulare specifico per evitare la degradazione del nucleotide. Sono state seminate 100.000 cellule in piastre da 96 pozzetti e lasciate aderire per un giorno. Successivamente sono state lisate con 10 µl di soluzione di lisi alla quale sono stati aggiunti 100 µl di soluzione diluente per stabilizzare l'ATP.

La sospensione è stata poi introdotta nella camera del luminometro, sono stati aggiunti 100 μ l di luciferina-luciferasi ed è stata registrata l'emissione di luce proporzionale alla concentrazione di ATP prodotto dalla cellula. Dove indicato le cellule sono state incubate per 16 ore in presenza di 600 μ M oATP.

La concentrazione di ATP ottenuta è stata normalizzata per il contenuto di proteine presenti nel lisato cellulare.

Per determinare la concentrazione proteica del lisato cellulare è stato utilizzato il metodo *Bradford* che consiste nel quantificare il legame del colorante *Comassie brilliant blu* con le proteine e nel rapportare il risultato a quello ottenuto tra lo stesso colorante e una proteina *standard* a concentrazione nota, l'albumina di siero bovino.

Le cellule, preparate in aliquote da 100.000, sono state lisate con 10 μ l di soluzione di lisi alla quale sono stati aggiunti 100 μ l di soluzione stabilizzante. Di questa sospensione 5 μ l e 10 μ l sono stati aggiunti in due provette contenenti 1 ml di reattivo di *Bradford* (100 mg/l di *Comassie G 250*, 50 ml/l di etanolo, 100 ml/l di acido ortofosforico). Le letture di assorbanza sono state eseguite allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. Come *standard* è stata utilizzata una soluzione di BSA 1 mg/ml di cui vanno aggiunti, per le misure, 2, 4, 6 μ l in tre provette contenenti 1 ml di reattivo di *Bradford*. La lettura allo spettrofotometro di questi campioni riportata contro la loro concentrazione, in scala lineare, servirà come curva di taratura al fine di determinare, per estrapolazione, la loro concentrazione dalle letture degli altri campioni.

Proliferazione

Le cellule seminate in piastre di plastica da 6 pozzetti sono state risospese in terreno DMEM-F12 in presenza o in assenza di 10% FCS e mantenute in incubatore a 37 °C. Sono

state contate a diversi intervalli di tempo all'interno di una cameretta Burkner con un microscopio a contrasto di fase Olympus.

Analisi microscopica e *videoimaging*

Le cellule HEK293 e HeLa sono state seminate su vetrini sterili di 40 mm di diametro al fine di raggiungere il 50% della confluenza dopo 24 o 48 ore. I vetrini sono stati preventivamente sterilizzati tramite immersione in etanolo al 70% e veloce passaggio sulla fiamma di un *bunsen*. Per favorire l'adesione delle cellule HEK293 al vetro, dopo sterilizzazione i vetrini sono stati polilisinati per 30 minuti e lavati per 3 volte con 1 ml H₂O sterile.

Per l'analisi al microscopio delle cellule sono stati utilizzati per ogni vetrino 2 ml di soluzione salina avente la seguente composizione: 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES, 5.5 mM glucosio, 5 mM NaHCO₃, pH 7.4.

E' seguita l'aggiunta di 1 mM CaCl₂ o 0.5 mM EGTA (chelante del calcio) a seconda del tipo di esperimento. Il vetrino è stato sistemato in una camera termostata Leyden (modello TC-202A, Medical Systems Corp., NY, USA) montata sullo stativo di un microscopio invertito Nikon Eclipse TE300 (Nikon, Tokyo, Giappone) e mantenuta alla temperatura di 37°C. Il microscopio è dotato di epifluorescenza e motorizzazione piezoelettrica dell'obiettivo (Physic Instrumente, GmbH & Co., Germania).

La fluorescenza viene captata da una telecamera digitale CCD (Princeton Instruments, AZ, USA) e l'immagine visualizzata utilizzando il *software* Metamorph (Universal Imaging Corporation, PA, USA). Il sistema dispone inoltre di filtri di eccitazione e di emissione. Le immagini sono poi analizzate utilizzando un algoritmo di analisi e ricostruzione tridimensionale sviluppato dal Biomedical Imaging Group della University of Massachusetts Medical School (Worcester, MA, USA) al fine di ottenere un'immagine

“ripulita” del segnale spurio e con una nitidezza pari a quella ottenibile in microscopia confocale. La funzione algoritmica necessaria per la deconvoluzione è ricavata dall’analisi di una singola sorgente luminosa ottenendo il “PSF” (*point spread function*) cioè la funzione relativa alla fluorescenza di un punto luminoso allargato, che viene poi confrontata con quella dell’immagine del campione analizzato. La funzione viene applicata ad ogni piano del campione fluorescente eliminando così dall’immagine tutto il segnale derivante dai piani fuori fuoco.

Analisi dei dati

Tutti i dati mostrati rappresentano la media \pm errore standard (ES) della media. Per valutare la significatività è stato utilizzato il test *t* di Student effettuato con il *software* Graphpad InStat (Graphpad, San Diego, CA, USA). La velocità di accumulo del Ca^{2+} e la quantità totale di Ca^{2+} rilasciato sono state calcolate con il *software* Origin (OriginLab, Northampton, MA, USA) rispettivamente come derivata prima e seconda del grafico ottenuto riportando in ascissa il tempo ed in ordinata la concentrazione di calcio.

SCOPO

Il recettore P2X₇ (P2X₇R) è un canale ionico di membrana attivato dall'ATP extracellulare. La stimolazione di P2X₇R con basse dosi di ATP determina la permeabilizzazione della membrana plasmatica a cationi monovalenti e divalenti come Na⁺, Ca²⁺ e K⁺. A seguito di una esposizione protratta oppure ripetuta all'agonista, il recettore va incontro ad una transizione canale-poro. Si forma infatti, un poro non selettivo che permette un trasporto bidirezionale di molecole idrofile di dimensioni maggiori (fino a 900 Da). L'ATP extracellulare è uno stimolo che induce morte cellulare proprio per la sua capacità di causare l'apertura del poro di membrana P2X₇.

Studi recenti evidenziano il ruolo di questa proteina nella proliferazione cellulare e nella proliferazione della cellula neoplastica. Il primo modello cellulare in cui è stato osservato come il recettore P2X₇ induca proliferazione è rappresentato dai linfociti T (Baricordi *et al.*, 1996). L'ATP extracellulare determina in queste cellule un aumento della concentrazione citoplasmatica dello ione Ca²⁺ e depolarizzazione della membrana plasmatica. Un ulteriore passo avanti nell'analisi del possibile coinvolgimento del recettore nel promuovere la proliferazione è stato fatto osservando il comportamento di linfociti B umani transfettati con il cDNA di P2X₇R umano. Queste cellule acquisiscono la capacità di sopravvivere e moltiplicarsi in assenza di siero, caratteristica propria delle cellule tumorali. La proliferazione è permessa dal rilascio autocrino/paracrino di ATP: le cellule esprimenti il recettore P2X₇ rilasciano una quantità di ATP quattro volte superiore rispetto a quella rilasciata dalle cellule che non lo esprimono. L'incubazione con apirasi o con inibitori del recettore previene, infatti, la proliferazione (Baricordi *et al.*, 1999).

Le basi biochimiche della stimolazione della proliferazione cellulare sono ancora sconosciute.

La stimolazione ripetuta del recettore purinergico P2X₇ con elevate concentrazioni dell'agonista ATP, può causare la morte cellulare per apoptosi accompagnata da caratteristiche modificazioni cellulari come condensazione nucleare, frammentazione del DNA e attivazione di alcune caspasi come casp-1, -3 e -8 in cellule microgliali (Ferrari *et al.*, 1999). Ancora, P2X₇R è in grado di innescare l'attività della protein chinasi attivata da stress SAPK/JNK, determinare il rilascio di citocromo c dai mitocondri e l'esposizione reversibile di fosfatidilserina (PS) sulla membrana plasmatici (MacKenzie *et al.*, 2001, MacKenzie *et al.*, 2005).

Scopo del mio lavoro è stato verificare se l'espressione di P2X₇R inducesse gli stessi effetti nella linea cellulare HEK293 (*human embryonic kidney*). Questa linea cellulare rappresenta un buon modello per lo studio degli effetti della stimolazione di P2X₇R in quanto le cellule *wild type* non esprimono alcun recettore della famiglia P2X (Morelli *et al.*, 2003). Al fine di evitare eventuali effetti dovuti alla selezione clonale, gli esperimenti sono stati eseguiti su tre cloni stabili. Le cellule sono state transfettate stabilmente con vettori plasmidici contenenti il cDNA che codifica P2X₇R umano o il solo vettore (cellule di controllo).

In particolare, ho verificato se la transfezione di P2X₇R conferisse alle cellule un vantaggio proliferativo. Poiché il recettore è attivato dall'ATP e la proliferazione è supportata da una stimolazione autocrina e paracrina ATP-dipendente, ho anche verificato se le cellule che esprimono il recettore abbiano un contenuto di ATP maggiore rispetto alle cellule di controllo.

Ho valutato inoltre, il ruolo svolto dal Ca²⁺ nel processo proliferativo con particolare attenzione a quello contenuto nel RE, uno dei principali organelli di accumulo dello ione, e gli effetti di una stimolazione farmacologia del recettore sulla morfologia cellulare, sul

potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_m$) e sulla concentrazione di calcio nei mitocondri $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$.

RISULTATI

Le cellule HEK293-hP2X₇R hanno una concentrazione di calcio mitocondriale più elevata rispetto ai controlli

E' noto come un elevato $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ determini il trasporto di Ca^{2+} all'interno del mitocondrio con conseguente incremento della concentrazione del catione nella matrice mitocondriale. Mentre aumenti sostenuti della $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ provocano il collasso del $\Delta\Psi_{\text{mt}}$ e la frammentazione della rete mitocondriale, piccoli aumenti intermittenti della $[\text{Ca}^{2+}]$ aumentano la funzionalità mitocondriale e la produzione di ATP.

Allo scopo di determinare la concentrazione di calcio all'interno dei mitocondri, i cloni HEK293-hP2X₇R e le cellule di controllo sono stati transfettati con la fotoproteina calcio-sensibile aequorina mitocondriale (mtAEQ) (Rizzuto *et al.*, 1993) che, in presenza del cofattore celenterazina, emette luce di intensità proporzionale alla $[\text{Ca}^{2+}]$ presente nel compartimento intracellulare *target* della fotoproteina.

La **Figura 1 (A e B)** mostra che la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ basale delle cellule di controllo ha valori inclusi tra i 100 ed i 300 nM mentre quella delle cellule HEK293-hP2X₇R ha valori medi attorno a 1-2 μM . Uno stimolo extracellulare capace di mobilizzare calcio dal RE via recettori dell'InsP3 (carbacolo), determina un aumento transiente della $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ (**C**). Nelle cellule HEK293-hP2X₇R la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ basale è maggiore rispetto alle cellule di controllo e la stimolazione con carbacolo determina un incremento di tre volte della stessa (**B e C**). Un incremento anche maggiore della $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ si verifica anche in assenza di Ca^{2+} extracellulare, in presenza del chelante ad alta affinità per il Ca^{2+} EGTA, a dimostrazione dell'importanza del contributo del Ca^{2+} del RE (**D**).

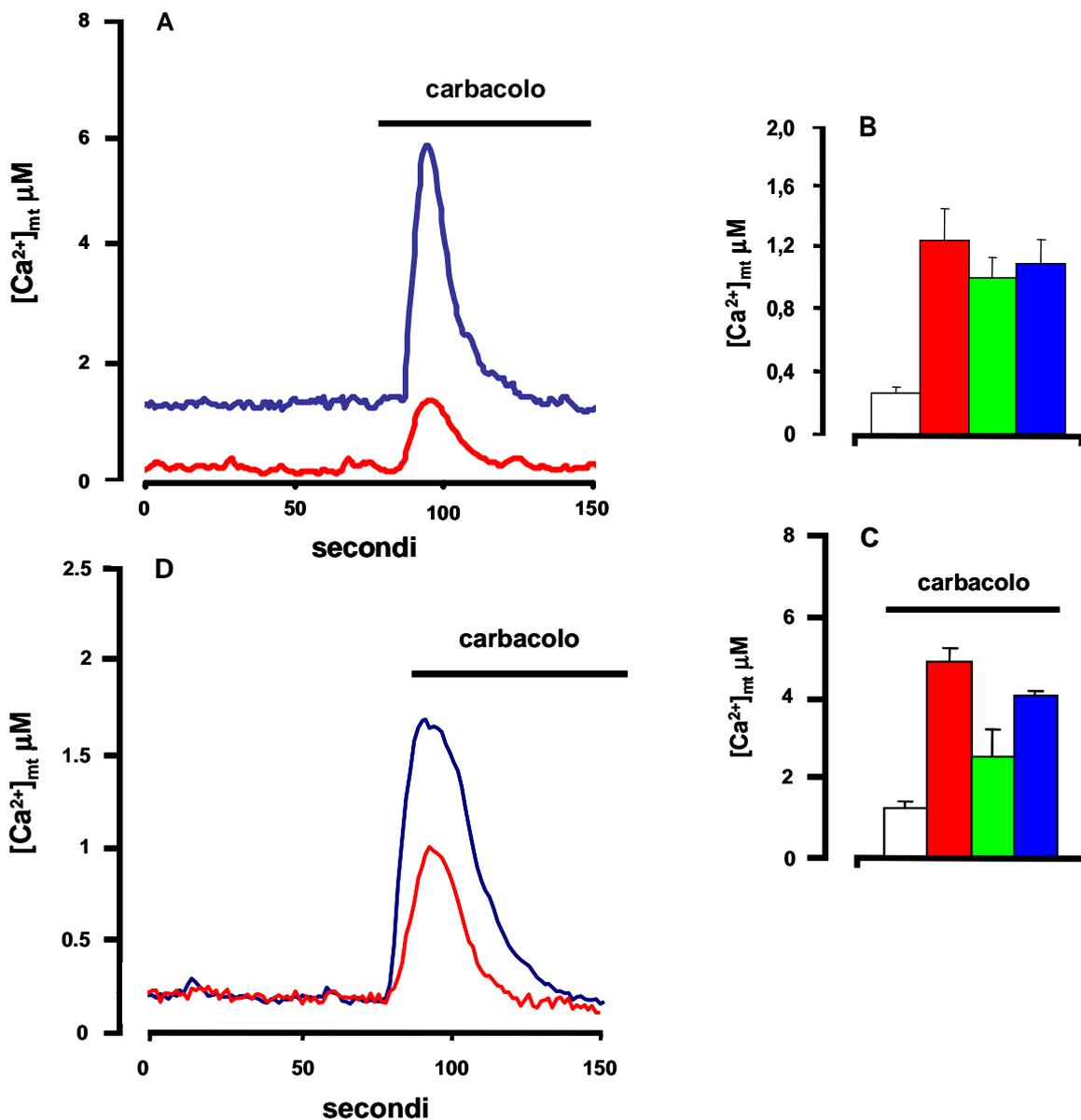


Fig. 1 La transfezione del recettore $P2X_7$ aumenta la $[Ca^{2+}]_{mt}$ basale e la $[Ca^{2+}]_{mt}$ a seguito di stimolazione con carbacolo. (A) La figura mostra che la $[Ca^{2+}]_{mt}$ basale delle cellule HEK293-hP2X₇R (traccia blu) è maggiore rispetto a quella delle cellule HEK293-mock (valori compresi tra 100-300 nM) (traccia rossa). L'aggiunta di 100 μM carbacolo determina un incremento della $[Ca^{2+}]_{mt}$ tre volte maggiore nelle cellule transfettate con il recettore rispetto al controllo. Le tracce sono rappresentative degli esperimenti eseguiti. Istogrammi riassuntivi di 15 esperimenti indipendenti che mostrano come la $[Ca^{2+}]_{mt}$ basale (B) e a seguito di stimolazione con 100 μM carbacolo (C) dei tre differenti cloni HEK293-hP2X₇R (barra rossa: clone A, barra verde: clone B, barra blu: clone C) sia significativamente maggiore rispetto alle cellule di controllo (barra bianca). Anche in assenza di Ca^{2+} extracellulare, l'aggiunta di carbacolo determina un incremento della $[Ca^{2+}]_{mt}$ maggiore nelle cellule HEK293-hP2X₇R rispetto ai controlli (D). I dati sono espressi come valori medi ± ES ($p \leq 0.005$, test t di Student). Le misurazioni sono state eseguite con luminometro dopo transfezione transiente con mtAEQ.

Le medie dell'aumento della $[Ca^{2+}]_{mt}$ a seguito della stimolazione con carbacolo delle cellule HEK293-mock e dei tre differenti cloni HEK293-hP2X₇R sono riportate in **Figura 1C**, mentre le medie delle $[Ca^{2+}]_{mt}$ basale sono mostrate in **Figura 1B**.

Le cellule HEK293-hP2X₇R trattate con carbacolo hanno una maggiore concentrazione citoplasmatica di calcio rispetto ai controlli

Come accennato precedentemente, il carbacolo rappresenta uno stimolo extracellulare capace di mobilitare il rilascio di calcio dal RE al citosol via recettori InsP₃.

Le cellule HEK293-hP2X₇ e HEK293-mock sono state caricate con l'indicatore fluorescente Fura-2/AM a 37°C in soluzione salina *standard*, in assenza di calcio extracellulare ed in presenza di EGTA (vedi Metodi).

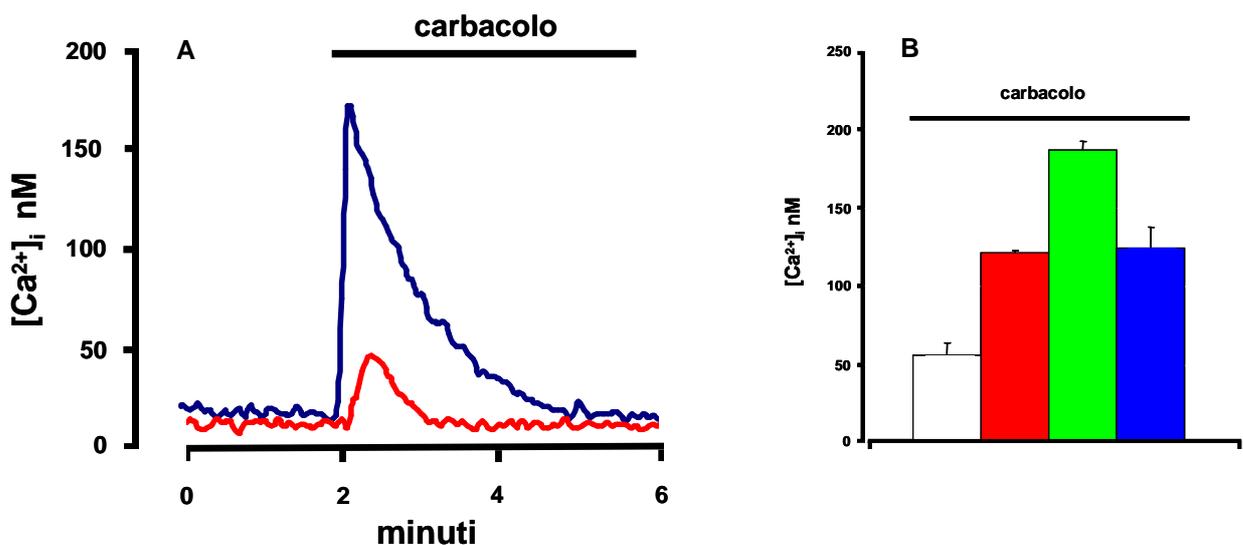


Fig. 2 Le cellule HEK293-hP2X₇R rilasciano nel citosol una maggiore quantità di calcio a seguito del trattamento con carbacolo, in assenza di calcio extracellulare. (A) L'aggiunta di 500 μM carbacolo determina un incremento della $[Ca^{2+}]_i$ maggiore nelle cellule transfettate con il recettore HEK293-hP2X₇R (traccia blu) rispetto al controllo HEK293-mock (traccia rossa). (B) Istogrammi riassuntivi di 15 esperimenti indipendenti che mostrano come la $[Ca^{2+}]_i$ rilasciato a seguito di una stimolazione con 500 μM carbacolo dai tre differenti cloni HEK293-hP2X₇R (barra rossa: clone A, barra verde: clone B, barra blu: clone C) sia significativamente maggiore rispetto alle cellule di controllo (barra bianca). I dati sono indicati ± ES ($p \leq 0.005$, test *t* di Student). Le misurazioni sono state eseguite con fluorimetro a seguito di incubazione delle cellule con l'indicatore fluorescente fura-2/AM.

Come mostrato in **Figura 2A**, a seguito del trattamento con 500 μM carbacolo, le cellule che esprimono il recettore hP2X₇ rilasciano dal RE nel citosol, una quantità di calcio maggiore rispetto alle cellule di controllo.

Le cellule HEK293-hP2X₇R possiedono una maggiore quantità di calcio nel reticolo endoplasmatico ed una maggiore attività delle pompe SERCA rispetto ai controlli

Dal momento che le cellule HEK293-hP2X₇R a seguito della stimolazione con carbacolo presentano una maggiore concentrazione di Ca²⁺ citoplasmatico, ho verificato se questo aumento fosse dovuto ad una maggiore concentrazione dello ione nel RE, trattando le cellule con tapsigargina. La tapsigargina agisce bloccando irreversibilmente le pompe SERCA. In questo modo viene bloccata l'entrata di Ca²⁺ nel RE e lo ione passa spontaneamente dall'organello al citosol.

E' stata aggiunta tapsigargina (2 μM) alla salina *standard* priva di calcio (in presenza di EGTA) contenente le cellule precedentemente incubate con l'indicatore fluorescente fura-2/AM ed è stata misurata la [Ca²⁺] rilasciata nel citosol (vedi Metodi).

L'inibitore determina il completo svuotamento di calcio dal RE e come mostrato in **Figura 3**, l'area sotto il picco delle cellule transfettate con il recettore hP2X₇ è maggiore rispetto a quella delimitata dalla curva delle cellule di controllo (**A**). Questo dato fa presupporre una maggiore quantità di calcio contenuta nel RE delle cellule HEK293-hP2X₇R (**B**).

La **Figura 4A** mette a confronto la velocità di accumulo del calcio da parte delle pompe SERCA mediante un saggio di reintroduzione del calcio la cui concentrazione è misurata tramite la transfezione delle cellule con la fotoproteina calcio-sensibile aequorina reticolare (erAEQ).

Le cellule HEK293-hP2X₇R e HEK293-mock sono state trattate per 10 minuti a temperatura ambiente con l'inibitore reversibile delle SERCA, 50 μM terbutil idrochinone

(TBHQ), in assenza di calcio extracellulare ed in presenza di 0.5 mM EGTA al fine di bloccare l'attività delle pompe del calcio e permettere il completo svuotamento dallo ione del RE.

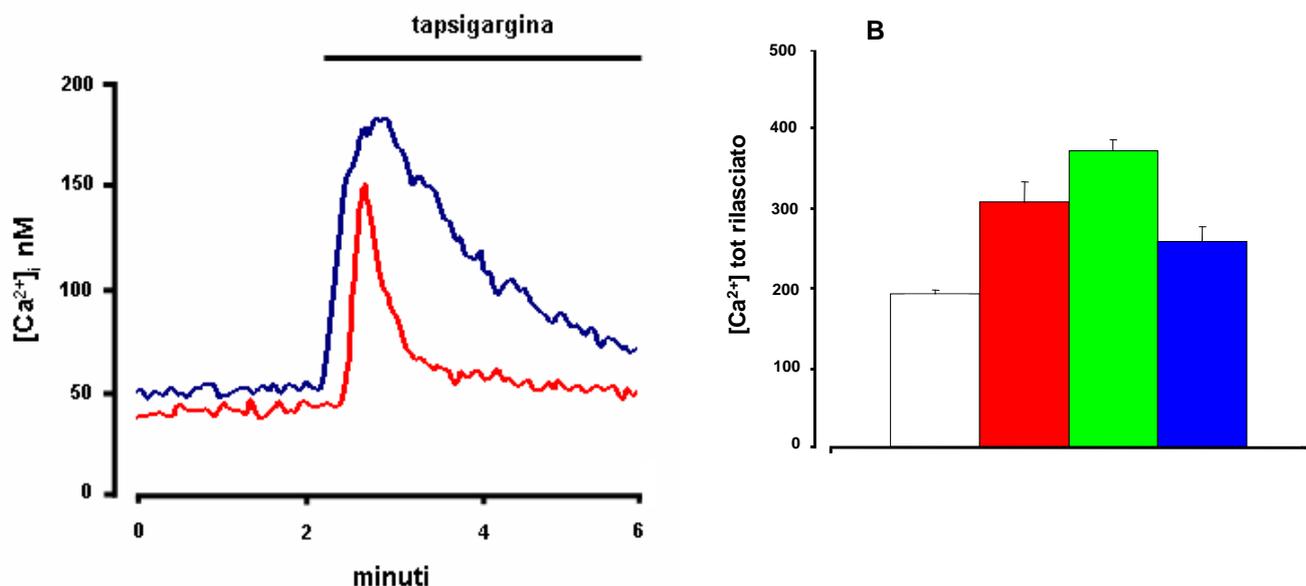


Fig. 3 Le cellule HEK293-hP2X₇R hanno una maggiore concentrazione di calcio nel RE. (A) L'area sotto il picco della curva che rappresenta il rilascio di Ca²⁺ nel citosol a seguito del trattamento con l'inibitore irreversibile delle pompe SERCA, tapsigargina (2 μM), è maggiore nelle cellule HEK293-hP2X₇R (traccia blu) rispetto al controllo HEK293-mock (traccia rossa). E' quindi maggiore anche la [Ca²⁺]_{RE} contenuta nel RE di queste cellule. Le tracce sono rappresentative di valori medi. (B) Istogrammi riassuntivi di 15 esperimenti indipendenti che mostrano come la [Ca²⁺]_{RE} (nM) a seguito del trattamento con 2 μM tapsigargina dei tre differenti cloni HEK293-hP2X₇R (barra rossa: clone A, barra verde: clone B, barra blu: clone C) sia significativamente maggiore rispetto alle cellule di controllo (barra bianca). I dati sono espressi come valori medi ± ES ($p \leq 0.001$, test t di Student). Le misurazioni sono state eseguite come per la Fig. 2.

Dopo due lavaggi con salina *standard* priva di calcio, le cellule sono state perfuse con una soluzione contenente 1 mM CaCl₂ e sono stati seguiti nel tempo gli aumenti della concentrazione del Ca²⁺ nel RE a seguito dell'attività delle SERCA. La pendenza delle curve rappresenta la velocità di riaccumulo dello ione da parte delle pompe. E' evidente

che tale velocità è maggiore nelle cellule HEK293-hP2X₇R rispetto ai controlli, ad indicare che le SERCA delle cellule transfettate con il recettore hP2X₇ hanno una attività più elevata (**B**).

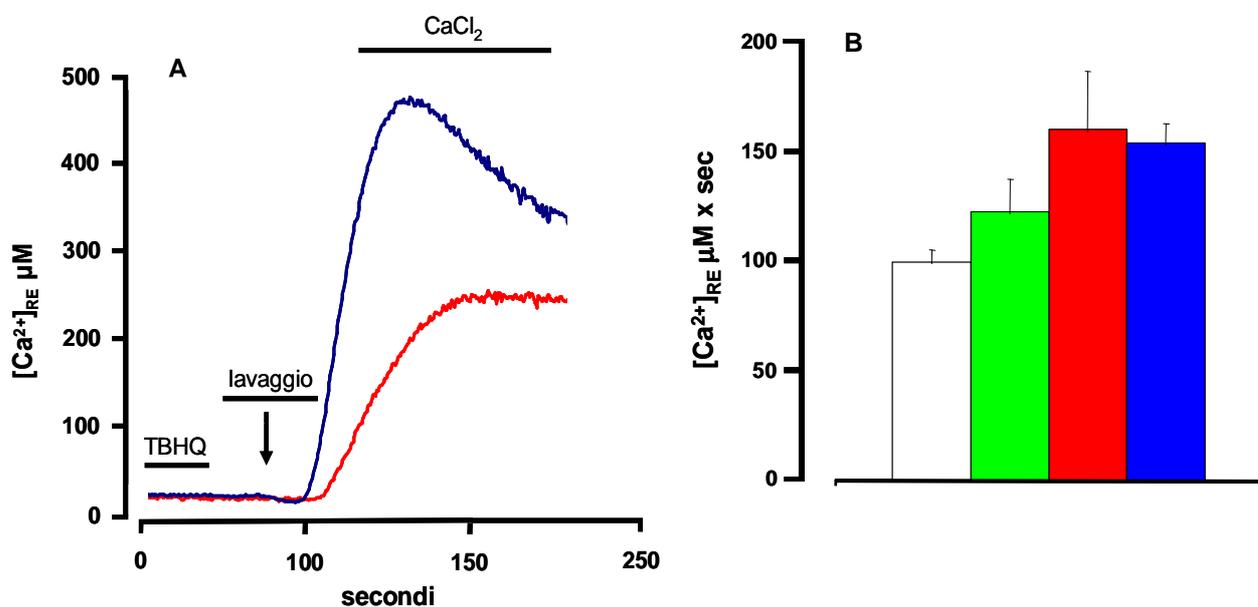


Fig. 4 L'attività delle SERCA è maggiore nelle HEK293-hP2X₇R rispetto ai controlli. (A) Le cellule HEK293-hP2X₇R e HEK293-mock sono state trattate con 50 µM TBHQ (per 10 minuti a temperatura ambiente, in assenza di calcio extracellulare ed in presenza di 0.5 mM EGTA) al fine di bloccare reversibilmente le pompe del calcio SERCA e permettere il completo svuotamento del RE. Dopo due lavaggi con salina standard priva di calcio per rimuovere l'inibitore, le cellule sono state perfuse con una soluzione contenente 1 mM CaCl₂ ed è stata seguita nel tempo la concentrazione del Ca²⁺ introdotto nel RE a seguito dell'attività delle SERCA. La velocità di riaccumulo dello ione da parte delle pompe è maggiore nelle cellule HEK293-hP2X₇R (traccia blu) rispetto alle cellule di controllo (traccia rossa), ad indicare che le SERCA delle cellule transfettate con hP2X₇R hanno un maggiore attività. (B) Istogrammi riassuntivi di 15 esperimenti indipendenti che mostrano come la [Ca²⁺]_{RE} x sec a seguito del trattamento con 50 µM TBHQ dei tre differenti cloni HEK293-hP2X₇R (barra rossa: clone A, barra verde: clone B, barra blu: clone C) sia significativamente maggiore rispetto alle cellule di controllo (barra bianca). I dati sono espressi come valori medi ± ES ($p \leq 0.01$, test t di Student). Le misurazioni sono state eseguite con luminometro dopo transfezione transiente con erAEQ.

Il recettore P2X₇ favorisce la sopravvivenza cellulare

Dal momento che l'aumento della concentrazione intracellulare di calcio è stato associato alla proliferazione cellulare (Juaville *et al.*, 1999), ho verificato se l'espressione del recettore P2X₇ favorisca la sopravvivenza delle cellule che lo esprimono. Baricordi e collaboratori hanno mostrato come P2X₇R sia in grado di conferire alle cellule trasformate B linfoblastoidi e K562 la capacità di crescere in assenza di siero (Baricordi *et al.*, 1999).

Le cellule HEK293 sono state transfettate con un plasmide contenente la sequenza del recettore umano P2X₇ e quindi selezionate con l'antibiotico gentamicina solfato per ottenere cloni stabili esprimenti hP2X₇R. Le cellule transfettate sono state clonate con la tecnica della diluizione seriale (Lefkovits and Waldmann, 1984).

Lo studio è stato eseguito su cellule HEK293 esprimenti il recettore P2X₇ umano (cloni A, B, C) e come controllo sono state utilizzate cellule HEK293 transfettate con il solo vettore (mock).

Allo scopo di verificare se la transfezione di P2X₇R favorisca la sopravvivenza delle cellule che lo esprimono, ho eseguito, utilizzando il microscopio a contrasto di fase, conte cellulari a intervalli di tempo regolari.

I risultati sono riportati in termini percentuali in **Figura 5**. Sia le cellule di controllo (traccia nera), sia quelle transfettate con il recettore P2X₇ umano (tracce rossa, verde e blu), se mantenute in DMEM-F12 in presenza di siero fetale bovino, proliferano seguendo la stessa cinetica (**A**).

Il risultato è ben diverso in cellule mantenute in assenza di siero: è evidente come, già dopo 24 ore, la crescita numerica delle cellule di controllo sia minima (traccia nera), mentre nei tre cloni transfettati sia aumentata (traccia rossa, verde e blu) (**B**).

Le cellule che esprimono il recettore continuano a proliferare per altre 24 ore, mentre il numero di cellule vive del controllo diminuisce tornando a valori simili a quello iniziale

(traccia nera). Dopo 48 ore, la proliferazione delle cellule transfettate con il recettore si arresta e si verifica una diminuzione della percentuale di cellule vive che, anche in questo caso, ritorna al valore iniziale nei cloni A e B (traccia rossa e verde), mentre rimane più elevato nel clone C (traccia blu).

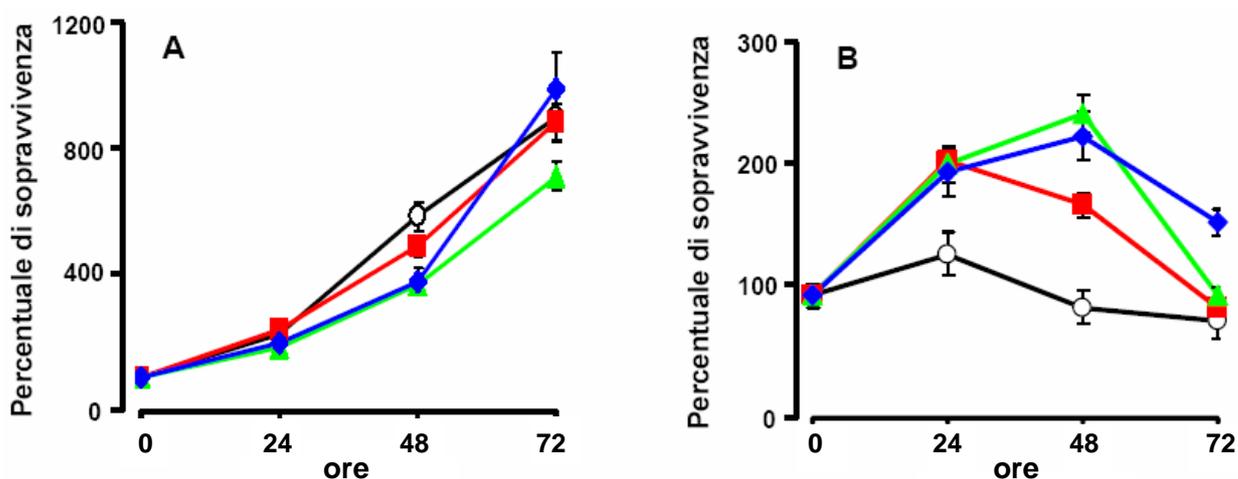


Fig. 5 L'espressione del recettore $P2X_7$ in HEK293 conferisce loro la capacità di sopravvivere in assenza di siero. Le cellule HEK293 transfettate con $P2X_7R$ umano, sono state risospese ad una concentrazione iniziale di $1 \times 10^5/ml$, in 2 ml di DMEM-F12 in presenza (A) o assenza (B) di siero fetale bovino ed esaminate per il tempo indicato. Le cellule HEK293-mock e HEK293-h $P2X_7$ risospese DMEM-F12 in presenza di siero, proliferano seguendo la stessa cinetica (A), mentre in assenza di siero, le cellule transfettate con il recettore mostrano una maggiore sopravvivenza rispetto a quelle di controllo (B).

Traccia nera: controllo; traccia rossa: HEK293-h $P2X_7$ clone A; traccia verde: HEK293-h $P2X_7$ clone B; traccia blu: HEK293-h $P2X_7$ clone C.

Effetto dell'inibizione del recettore P2X₇ sulla sopravvivenza cellulare

Per verificare l'importanza della funzionalità del recettore P2X₇ nel conferire un vantaggio per la sopravvivenza delle cellule in assenza di siero, ho effettuato una serie di esperimenti in presenza del suo inibitore oATP, analogo dell'ATP che lega covalentemente il recettore bloccandolo irreversibilmente.

Come mostra la **Figura 6**, in seguito all'incubazione con 600 μ M oATP, non si verifica proliferazione cellulare nell'arco di 48 ore sia in cellule di controllo (traccia nera), che in quelle transfettate con il recettore (traccia rossa, verde, blu), a dimostrazione dell'importanza del recettore P2X₇ nella sopravvivenza cellulare.

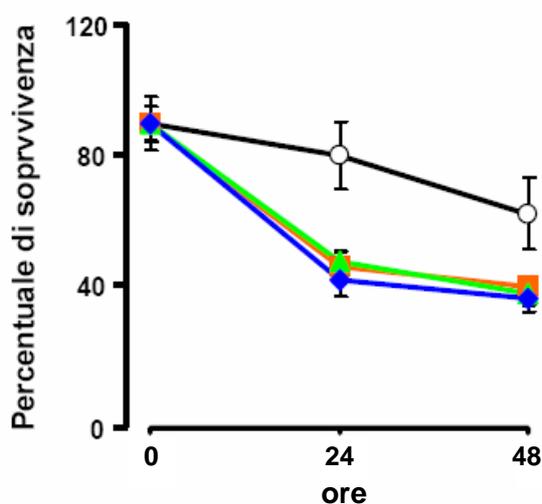


Fig. 6 Effetto dell'inibizione del recettore P2X₇ sulla sopravvivenza cellulare. Le cellule (1×10^5 /ml) sono state incubate in DMEM-F12 in assenza siero. A seguito dell'incubazione con 600 μ M oATP, nell'arco di 48 ore non si verifica proliferazione cellulare ne' delle cellule HEK293-mock, ne' delle HEK293-hP2X₇.

Traccia nera: controllo; traccia rossa: HEK293-hP2X₇ clone A; traccia verde: HEK293-hP2X₇ clone B; traccia blu: HEK293-hP2X₇ clone C.

La degradazione dell'ATP extracellulare ha sulla sopravvivenza cellulare un effetto simile all'inibizione del recettore

Per verificare se il vantaggio per la sopravvivenza cellulare sia determinato dall'attivazione del recettore P2X₇ da parte dell'ATP, ho deciso di verificare l'effetto dell'apirasi, un enzima in grado di idrolizzare l'ATP.

In **Figura 7** sono riportati i risultati ottenuti sia su cellule HEK293 transfettate con il recettore P2X₇, sia su cellule di controllo, in assenza di siero e trattate con apirasi (4 U/ml).

È evidente come la degradazione dell'ATP inibisca la crescita cellulare suggerendo che la sopravvivenza sia dovuta all'attivazione del recettore P2X₇ da parte del suo agonista. In questo caso la percentuale di cellule vive diminuisce drasticamente nell'arco di 48 ore, sia nelle cellule di controllo (traccia nera), sia in quelle che esprimono il recettore (traccia rossa, verde, blu).

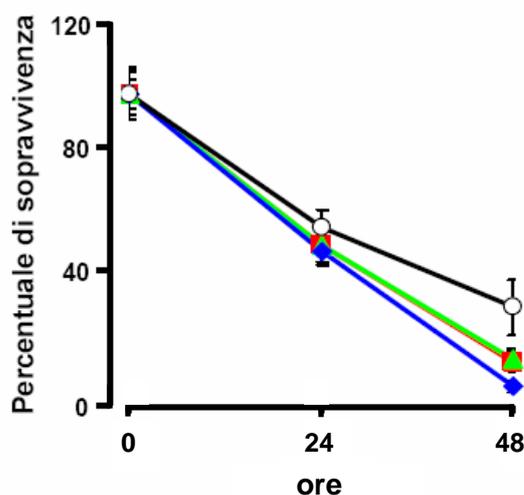


Fig. 7 Effetto dell'apirasi sulla proliferazione cellulare. Le cellule (1×10^5 /ml) sono state incubate in DMEM-F12 in assenza siero. A seguito dell'aggiunta apirasi (4 U/ml) la percentuale di cellule vive cala drasticamente nell'arco delle 48 ore sia delle cellule HEK293-mock che delle HEK293-hP2X₇. Traccia nera: controllo; traccia rossa: HEK293-hP2X₇ clone A; traccia verde: HEK293-hP2X₇ clone B; traccia blu: HEK293-hP2X₇ clone C.

Mentre l'oxoATP non influisce sulla sopravvivenza delle cellule di controllo, il trattamento con apirasi riduce drasticamente la percentuale di cellule vive. Probabilmente questo effetto è dovuto all'attivazione da parte dell'ATP di recettori P2Y₁₋₂ che possono supportare la sopravvivenza delle cellule HEK293.

Effetto dell'EGTA sulla sopravvivenza cellulare

Allo scopo di verificare se il vantaggio proliferativo indotto da P2X₇R sia mediato dall'influsso di calcio attraverso il recettore, ho effettuato esperimenti in presenza di EGTA. Questo reagente è stato aggiunto ad una concentrazione di 0.5 mM in modo da chelare tutto il calcio contenuto nel terreno di coltura.

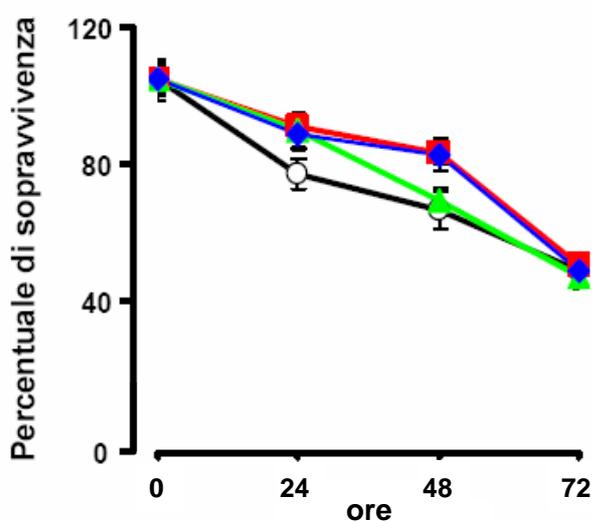


Fig. 8 Effetto dell'EGTA sulla proliferazione. Le cellule sono state incubate in DMEM-F12 privo di siero e addizionato di 0.5 mM EGTA. L'assenza di calcio nel terreno di coltura annulla il vantaggio per la sopravvivenza cellulare conferito alle cellule dal recettore P2X₇. Traccia nera: controllo; traccia rossa: HEK293-hP2X₇ clone A; traccia verde: HEK293-hP2X₇ clone B; traccia blu: HEK293-hP2X₇ clone C.

Dalla **Figura 8** è evidente che l'assenza di calcio nel terreno di coltura annulla il vantaggio per la sopravvivenza conferito alle cellule dall'attivazione del recettore P2X₇. La percentuale di cellule vive diminuisce nell'arco di 72 ore sia per le cellule di controllo che in quelle transfettate, con una cinetica simile.

Misurazione dell'ATP intracellulare

L'ATP è presente nel citoplasma di tutte le cellule ad una concentrazione compresa tra 5-10 mM, mentre la sua concentrazione nel plasma e nel fluido extracellulare è dell'ordine di 5-20 μM.

La maggiore sopravvivenza delle cellule transfettate con il recettore P2X₇ potrebbe dipendere dalla presenza di una maggior concentrazione di ATP nella cellula. La sopravvivenza potrebbe essere sostenuta da una produzione autocrina/paracrina di ATP. Il rilascio di questo nucleotide nello spazio pericellulare determinerebbe la stimolazione del recettore stesso con conseguente aumento della concentrazione di calcio intracellulare. Ciò potrebbe portare ad un aumento della sintesi di ATP a livello mitocondriale.

Per confermare tale ipotesi, ho misurato e paragonato il contenuto di ATP cellulare di cellule che esprimono il recettore con quello di cellule di controllo.

La concentrazione di ATP è normalizzata rispetto alla quantità di proteine cellulari ed espressa in nanomoli di ATP su mg di proteine.

La **Figura 9** mostra che cellule esprimenti il recettore P2X₇ (in rosso, in verde e in blu) hanno un contenuto di ATP di almeno due volte superiore alle cellule di controllo (in bianco).

Per valutare il coinvolgimento del recettore P2X₇ nella produzione di ATP, ho eseguito lo stesso esperimento su cellule pre-trattate con oATP.

Come mostra la **Figura 9**, dopo un'incubazione di 16 ore in presenza di 600 μM oATP, i livelli di ATP delle cellule esprimenti il recettore P2X₇ vengono drasticamente ridotti (in rosso, verde, blu, blu scuro).

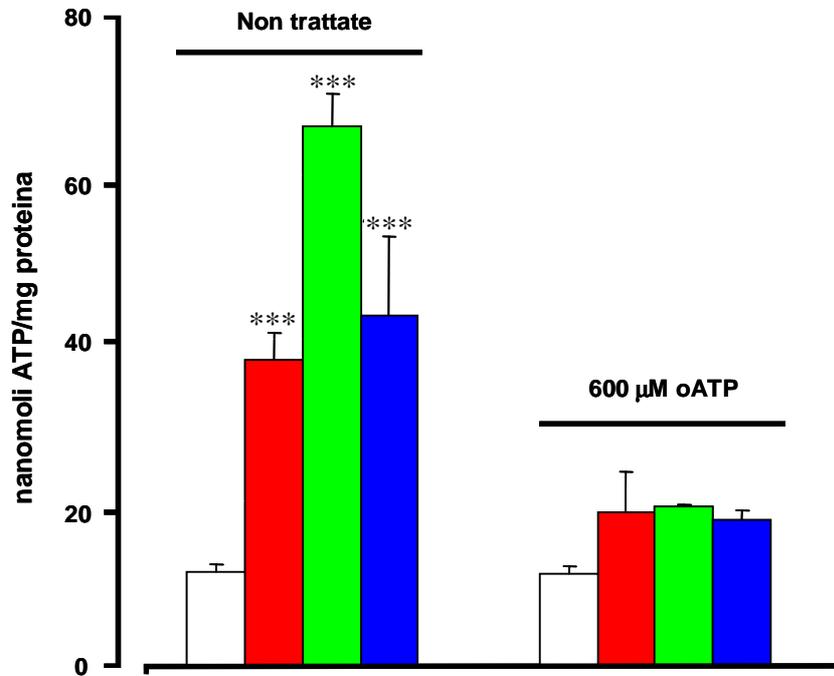


Fig. 9 Misura della produzione di ATP intracellulare. Le cellule (1×10^5 /pozzetto) sono state incubate in terreno DMEM-F12 completo. Per determinare la secrezione di ATP è stato usato il metodo della luciferina-luciferasi. I campioni trattati con oATP (600 μM) sono stati mantenuti in presenza di questo inibitore per tutta la durata dell'esperimento. La concentrazione di ATP intracellulare delle cellule che esprimono il recettore hP2X₇ è almeno due volte superiore a quella contenuta nelle cellule di controllo. Il trattamento con oATP riduce i livelli di ATP delle cellule esprimenti il recettore P2X₇.

Barra bianca: controllo; barra rossa: HEK293-hP2X₇ clone A; barra verde: HEK293-hP2X₇ clone B; barra blu: HEK293-hP2X₇ clone C. *** $p \leq 0.0001$ versus HEK293-mock.

Le cellule HEK293-hP2X₇R hanno un potenziale di membrana mitocondriale più elevato rispetto alle cellule di controllo

Tramite microscopia confocale è stato misurato il potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\Psi_{mt}$) basale e a seguito di stimolazione delle cellule HEK293 transfettate o meno con il recettore.

I tre cloni prodotti nel nostro laboratorio rispondono alla stimolazione con l'agonista ATP con una tipica risposta indotta dal recettore P2X₇: elevato e sostenuto influsso di calcio all'interno della cellula, collasso del $\Delta\Psi_{mt}$, permabilizzazione nei confronti di soluti idrofilici a basso peso molecolare, rigonfiamento cellulare e formazione di *blebs* di membrana (Morelli *et al.*, 2003).

Allo scopo di misurare il potenziale di membrana mitocondriale, le cellule sono state caricate con il marcatore fluorescente sensibile al potenziale TMRM (*tetramethyl rhodamine methyl ester*) (Scaduto and Grotyohann, 1999).

Come riportato in **Figura 10**, la fluorescenza basale di TMRM è due-tre volte maggiore nelle cellule HEK293-hP2X₇R rispetto alle cellule di controllo HEK293-mock. Le prime infatti, presentano un potenziale mitocondriale più negativo delle HEK293-mock.

Mentre il trattamento con oATP, ha un piccolo effetto sul $\Delta\Psi_{mt}$ delle cellule di controllo, determina il collasso del $\Delta\Psi_{mt}$ delle cellule HEK293-hP2X₇R.

L'incubazione con apirasi, enzima che degrada l'ATP extracellulare, determina una notevole diminuzione del $\Delta\Psi_{mt}$ nelle cellule che esprimono il recettore P2X₇, mentre ha scarso effetto sulle cellule di controllo.

Oltre che dall'ATP extracellulare, il $\Delta\Psi_{mt}$ delle cellule HEK293-hP2X₇R risulta dipendente dalla presenza di calcio extracellulare. Infatti, l'aggiunta di un eccesso di EGTA, determina il collasso del potenziale.

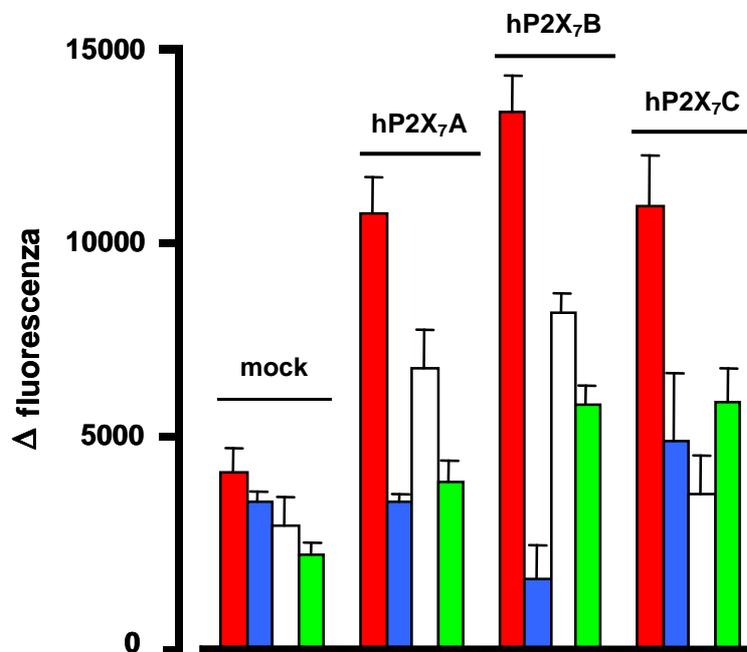


Fig. 10 L'espressione del recettore *hP2X₇* aumenta il $\Delta\Psi_{mt}$ delle cellule **HEK293**. Emissione di fluorescenza (in unità arbitrarie) delle cellule di controllo **HEK293-mock** e dei tre cloni stabili **HEK293-hP2X₇R** (clone A, B, C) caricati con la sonda mitocondriale fluorescente **TMRM**. La fluorescenza **FCCP-insensibile** è stata sottratta a tutti i valori riportati (Δ fluorescenza).

Barra rossa: controllo; barra blu: 600 μM oATP per 2 ore; barra bianca: 4 U/ml apirasi overnight; barra verde: 0.5 mM EGTA per 5 min.

La stimolazione farmacologica del recettore hP2X₇R determina il collasso del potenziale di membrana mitocondriale

Una stimolazione farmacologica con 3 mM ATP determina nelle cellule HEK293-hP2X₇R il collasso del $\Delta\Psi_{mt}$, mentre causa una modesta diminuzione nelle HEK293-mock (*Figura 11*).

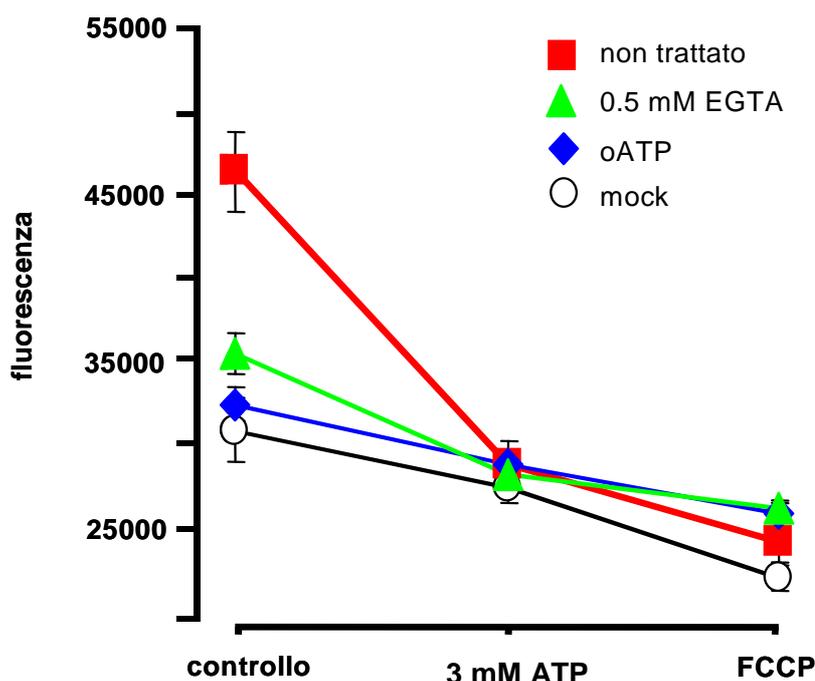


Fig. 11 Effetto dell'ATP su $\Delta\Psi_m$ basale. I valori di fluorescenza sono stati registrati da ogni vetrino immediatamente prima, e 15 min dopo l'aggiunta di ATP. Successivamente è stato aggiunto FCCP al fine di determinare il completo collasso di $\Delta\Psi_{mt}$.

Quadrato rosso: cellule HEK293-hP2X₇R incubate in salina standard 1 mM Ca²⁺; triangolo verde: HEK293-hP2X₇R in salina standard 0.5 mM EGTA; rombo blu: HEK293-hP2X₇R incubate in presenza di 600 μ M oATP; cerchio bianco: HEK293-mock incubate in salina standard 1 mM Ca²⁺. I dati si riferiscono a 10 esperimenti per ogni condizione. I dati sono espressi come valori medi \pm ES. La fluorescenza TMRM è statisticamente maggiore nei cloni HEK293-hP2X₇R rispetto alle HEK293-mock ($p \leq 0.0001$, test t di Student).

Per i tre cloni non sono state osservate differenze significative tra intensità di fluorescenza in condizioni basali e quelle in presenza di oATP, apirasi, EGTA ($p \leq 0.001$, test t di Student).

Il fatto che tale collasso non si verifichi se la stimolazione è preceduta da una pre-incubazione con oATP o se avviene nel mezzo privo di calcio, dimostra che l'attivazione di altri recettori P2 possa causare un modesto decremento del $\Delta\Psi_{mt}$.

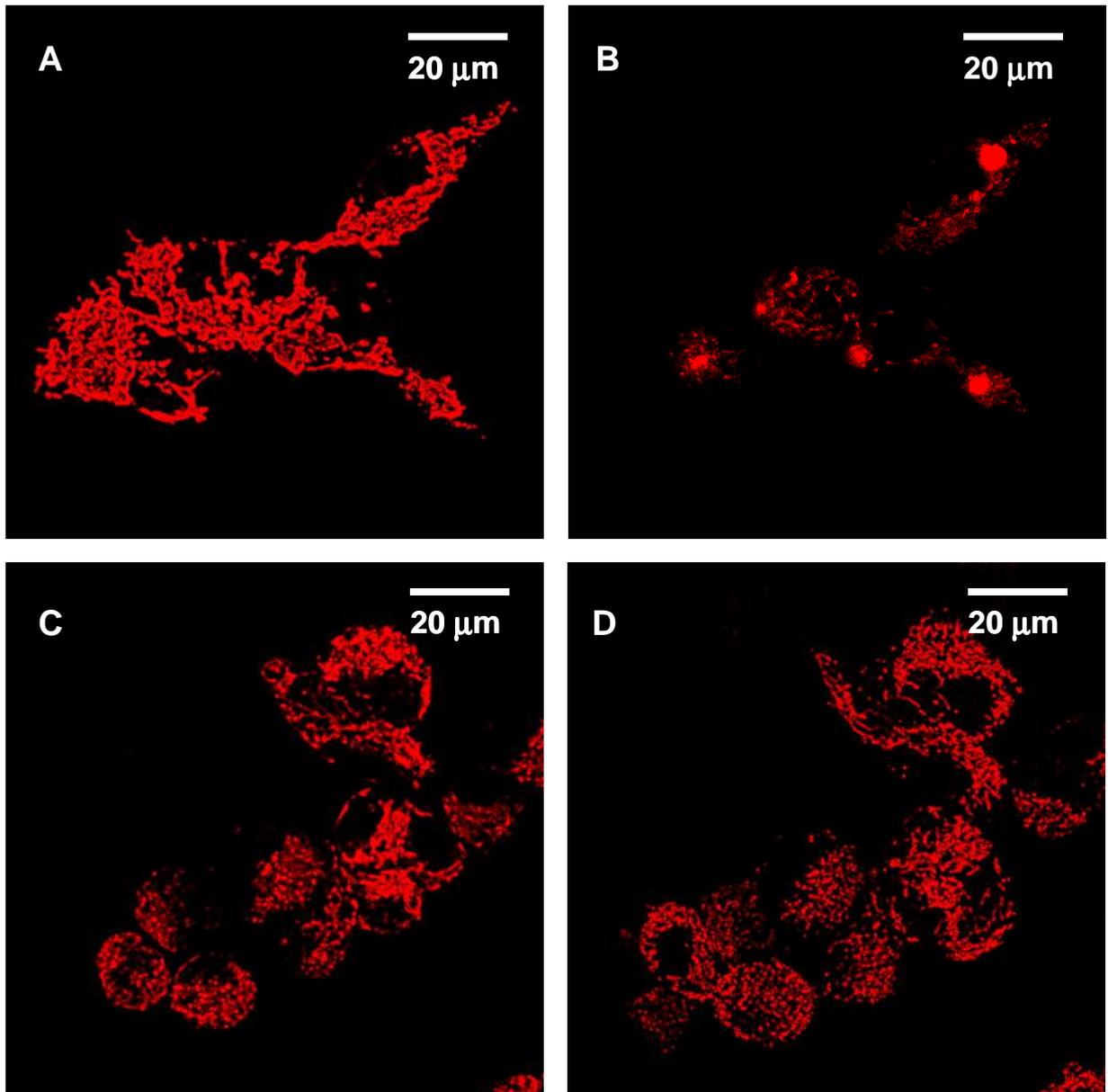


Fig. 12 Immagini di microscopia confocale di HEK293-hP2X₇R (A e B) e HEK293-mock (C e D) caricate con 20 nM TMRM ed incubate per 15 min in assenza (A e C) o presenza (B e D) di 3 mM ATP. Nelle HEK293 la rete mitocondriale è chiara e ben definita (A). La stimolazione con ATP determina una riduzione della fluorescenza e rigonfiamento dei mitocondri (B), mentre nelle cellule di controllo, la fluorescenza mitocondriale appare inalterata (C e D).

Potrebbe trattarsi dell'attivazione di P2Y₁R o P2Y₂R, accoppiati a rilascio di calcio dai depositi intracellulari (Morelli *et al.*, 2003). L'ATP non determina il collasso completo del $\Delta\Psi_{mt}$, infatti una ulteriore diminuzione è causata dal disaccoppiante mitocondriale FCCP.

La **Figura 12** mostra immagini di microscopia confocale di HEK293-hP2X₇R e HEK293-mock caricate con l'indicatore fluorescente TMRM, in condizioni basali e a seguito di stimolazione con 3 mM ATP. La stimolazione con ATP determina una notevole diminuzione della fluorescenza e rigonfiamento mitocondriale, mentre nelle cellule di controllo, la fluorescenza mitocondriale appare inalterata.

La stimolazione farmacologica del recettore hP2X₇ determina un accumulo di calcio nei mitocondri e la loro frammentazione

Oltre a determinare una drastica diminuzione del $\Delta\Psi_{mt}$, la stimolazione farmacologica del recettore hP2X₇R con 3 mM ATP determina l'ingresso nei mitocondri di una elevata quantità di Ca²⁺, maggiore nelle cellule HEK293-hP2X₇R rispetto alle cellule di controllo (**Figura 13A**). La [Ca²⁺]_{mt} delle cellule ritorna ai valori basali dopo 5-10 minuti. Le medie dell'aumento di tale concentrazione a seguito della stimolazione con l'agonista di hP2X₇R delle cellule HEK293-mock e dei tre differenti cloni HEK293-hP2X₇R sono riportate in **Figura 13B**.

Allo scopo di studiare l'effetto della stimolazione farmacologia del recettore sulla morfologia e distribuzione della rete mitocondriale, le cellule HEK293-hP2X₇R e HEK293-mock sono state trasfettate con un plasmide della proteina fluorescente mtGFP e seguite nel tempo mediante un sistema di *videoimaging*. Questa procedura non determina alterazioni della fisiologia cellulare e ha il vantaggio di permettere il monitoraggio in cellule vive. Inoltre, la fluorescenza della proteina chimerica è stabile nel tempo e non diminuisce a seguito di illuminazione (**Figura 14**).

Il trattamento con 3 mM ATP delle cellule transfettate con il recettore hP2X₇ determina massiccio ingresso di Ca²⁺ all'interno dei mitocondri seguito da una rapida e duratura modificazione della morfologia di questi organelli che appaiono frammentati dopo 15 minuti (B).

La frammentazione mitocondriale è accompagnata dalla formazione di rigonfiamenti di membrana chiamati *blebs* già descritti nelle HEK293 e nei macrofagi THP-1 (MacKenzie *et al.*, 2001; Morelli *et al.*, 2003) come tipica espressione di morte cellulare (D). Tali cambiamenti non si riscontrano nelle cellule di controllo HEK293-mock (F e H).

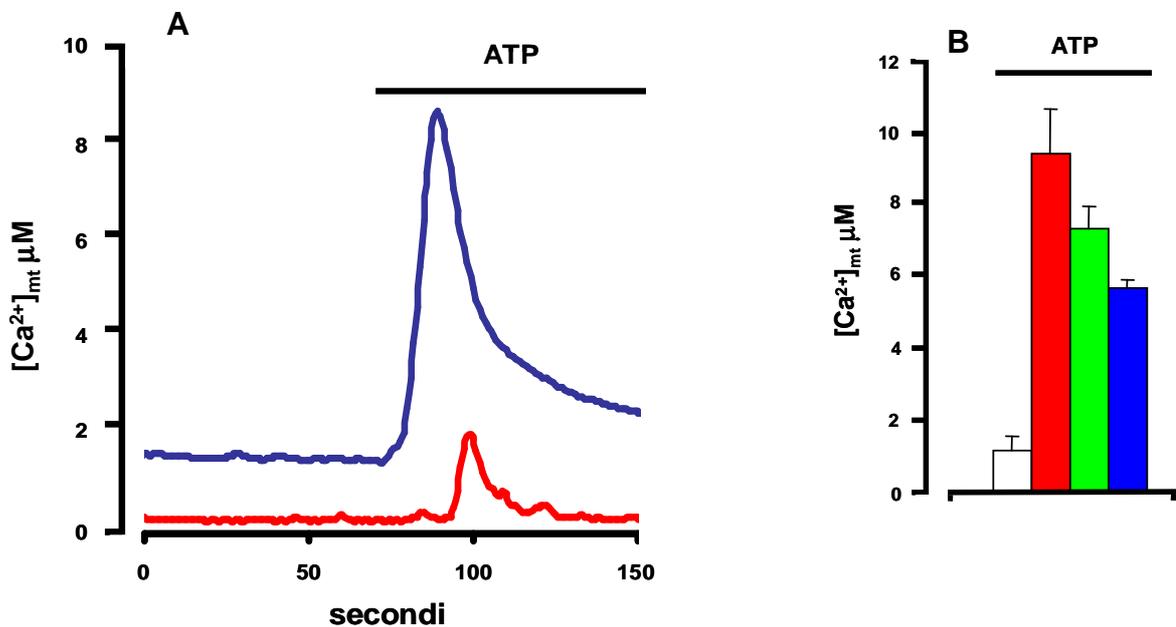


Fig. 13 La stimolazione del recettore P2X₇ determina un notevole aumento della $[Ca^{2+}]_{mt}$. (A) La figura mostra come l'aggiunta di 3 mM ATP causi un incremento della $[Ca^{2+}]_{mt}$ molto maggiore nelle cellule transfettate con il recettore (traccia blu) rispetto al controllo (traccia rossa). Le tracce sono rappresentative di valori intermedi. (B) Istogrammi riassuntivi di 15 esperimenti indipendenti che mostrano come la $[Ca^{2+}]_{mt}$ a seguito di stimolazione con ATP dei tre differenti cloni HEK293-hP2X₇R (barra rossa: clone A, barra verde: clone B, barra blu: clone C) sia significativamente maggiore rispetto alle cellule di controllo (barra bianca). I dati sono espressi come valori medi \pm ES ($p \leq 0.01$, test t di Student). Le misurazioni sono state eseguite con luminometro dopo transfezione transiente con mtAEQ.

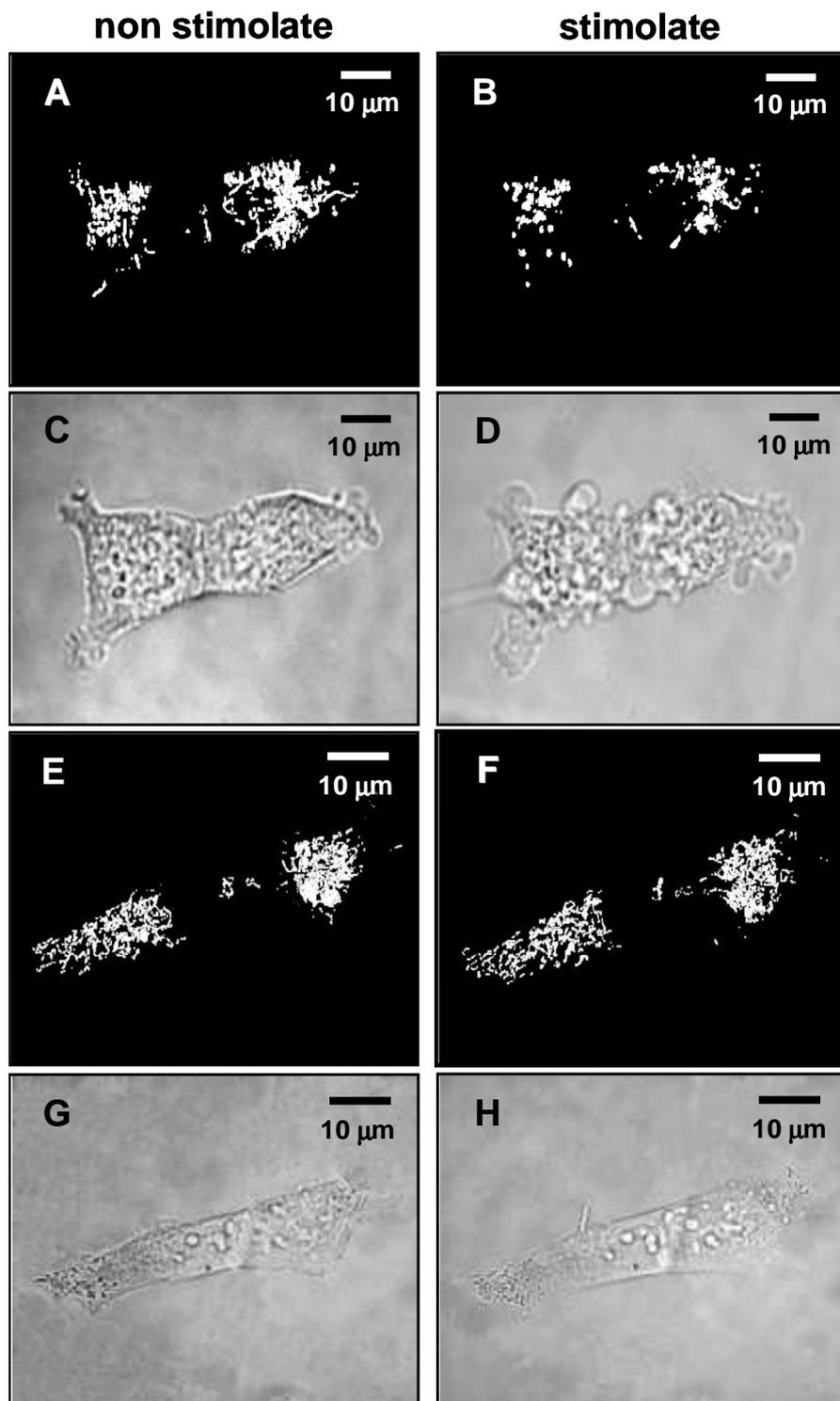


Fig. 14 La stimolazione farmacologica del recettore P2X₇ determina frammentazione mitocondriale e formazione di rigonfiamenti di membrana. Le cellule HEK293-hP2X₇R (A-D) e HEK293-mock (E-H) sono state transfettate transientemente con mtGFP e stimolate con 3 mM ATP. Immagini acquisite con microscopio Nikon, prima (A, C, E e G) e 15 min dopo l'aggiunta di 3 mM ATP (B, D, F e H) e successivamente deconvolute (vedi Metodi). Fluorescenza: A, B, E e F. Contrasto di fase: C, D, G e H. Percentuale di cellule transfettate: 15 ± 3.

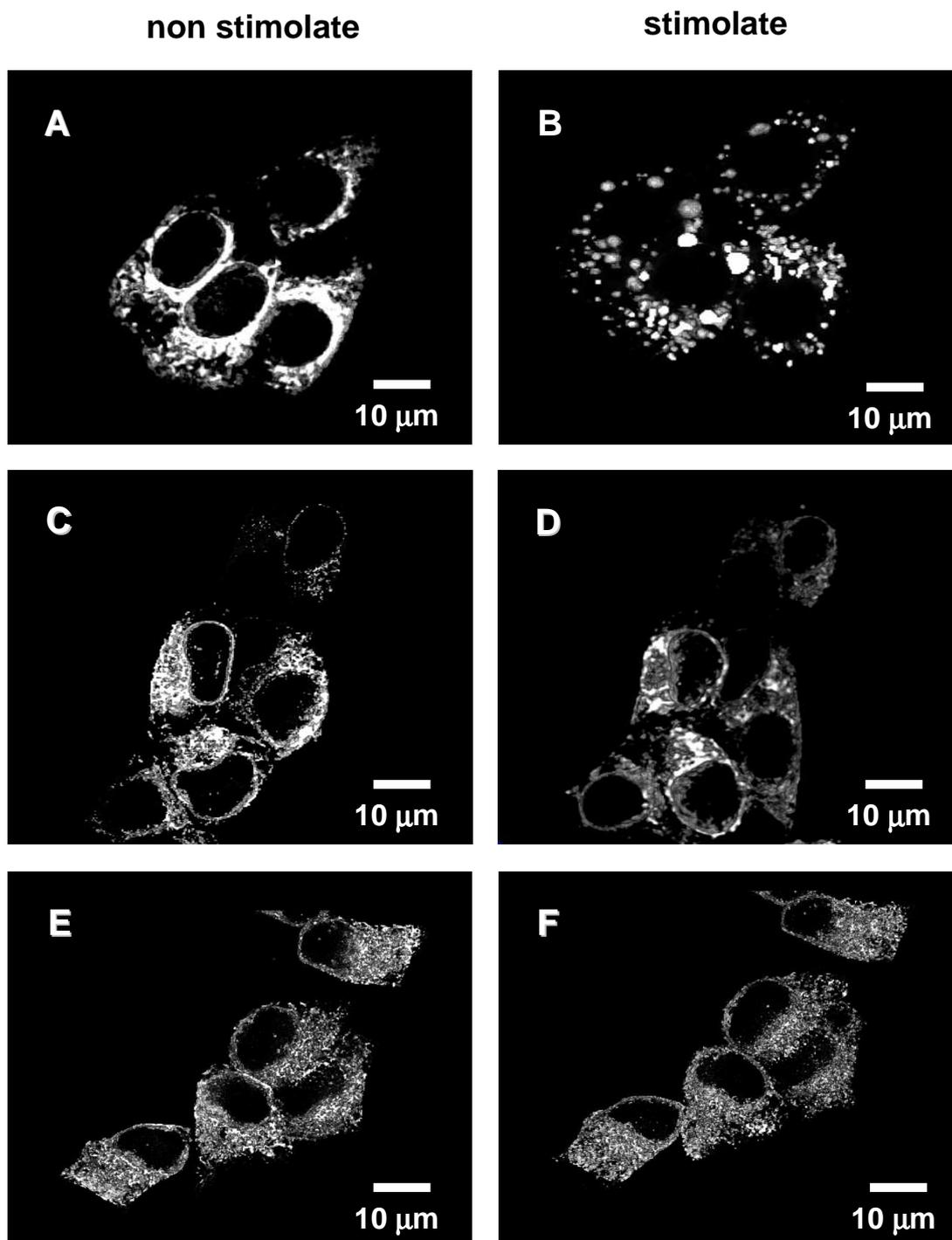


Fig. 15 La stimolazione farmacologica del recettore P2X₇ determina modificazioni morfologiche del RE. Le cellule HEK293-hP2X₇R (A, B, E e F) e HEK293-mock (C e D) transfettate transientemente con erGFP e stimulate con 300 μM BzATP. Le cellule dei pannelli E e F sono state pretrattate con 600 μM oATP. Immagini in fluorescenza acquisite con microscopio Nikon prima (A, C e E) e 30 min dopo addizione di BzATP (B, D e F) e deconvolute. Percentuale di cellule transfettate: 15 ± 3.

L'assenza di calcio extracellulare previene la frammentazione dei mitocondri nelle cellule transfettate con il recettore, sebbene si verifichino il collasso del $\Delta\Psi_{mt}$ e la formazione di *blebs* di membrana (non mostrato).

La stimolazione farmacologica del recettore P2X₇ determina anche frammentazione del RE

Oltre a determinare frammentazione della rete mitocondriale, il trattamento delle cellule HEK293-hP2X₇R con 300 μ M BzATP (miglior agonista P2X₇R conosciuto) determina un notevole cambiamento della morfologia del RE. La **Figura 15** mostra come, dopo 30 minuti dall'inizio della stimolazione, il RE delle cellule transfettate con il recettore (**A e B**) presenti grossi aggregati e una distribuzione meno omogenea rispetto alle cellule di controllo (**C e D**).

Il pretrattamento per 2 ore delle cellule con l'inibitore dell'attività recettoriale oATP (600 μ M) previene le modificazioni del RE, a conferma del coinvolgimento del recettore hP2X₇ (**E e F**).

Stimolazione farmacologia del recettore P2X₇ espresso in cellule HeLa

Oltre alle cellule HEK293-hP2X₇R, ho utilizzato cellule HeLa transientemente transfettate con hP2X₇R (HeLa-hP2X₇R). Questa linea cellulare derivante da un tumore della cervice uterina, è caratterizzata da una morfologia appiattita che permette una migliore risoluzione della rete mitocondriale rispetto alle cellule HEK293 (Rizzuto *et al.*, 1995).

Nelle HeLa-hP2X₇R, così come nelle cellule HEK293-hP2X₇R, la stimolazione con 300 μ M BzATP determina frammentazione mitocondriale e tipici rigonfiamenti di membrana, entrambe manifestazioni che precedono la morte cellulare (**Figura 16**).

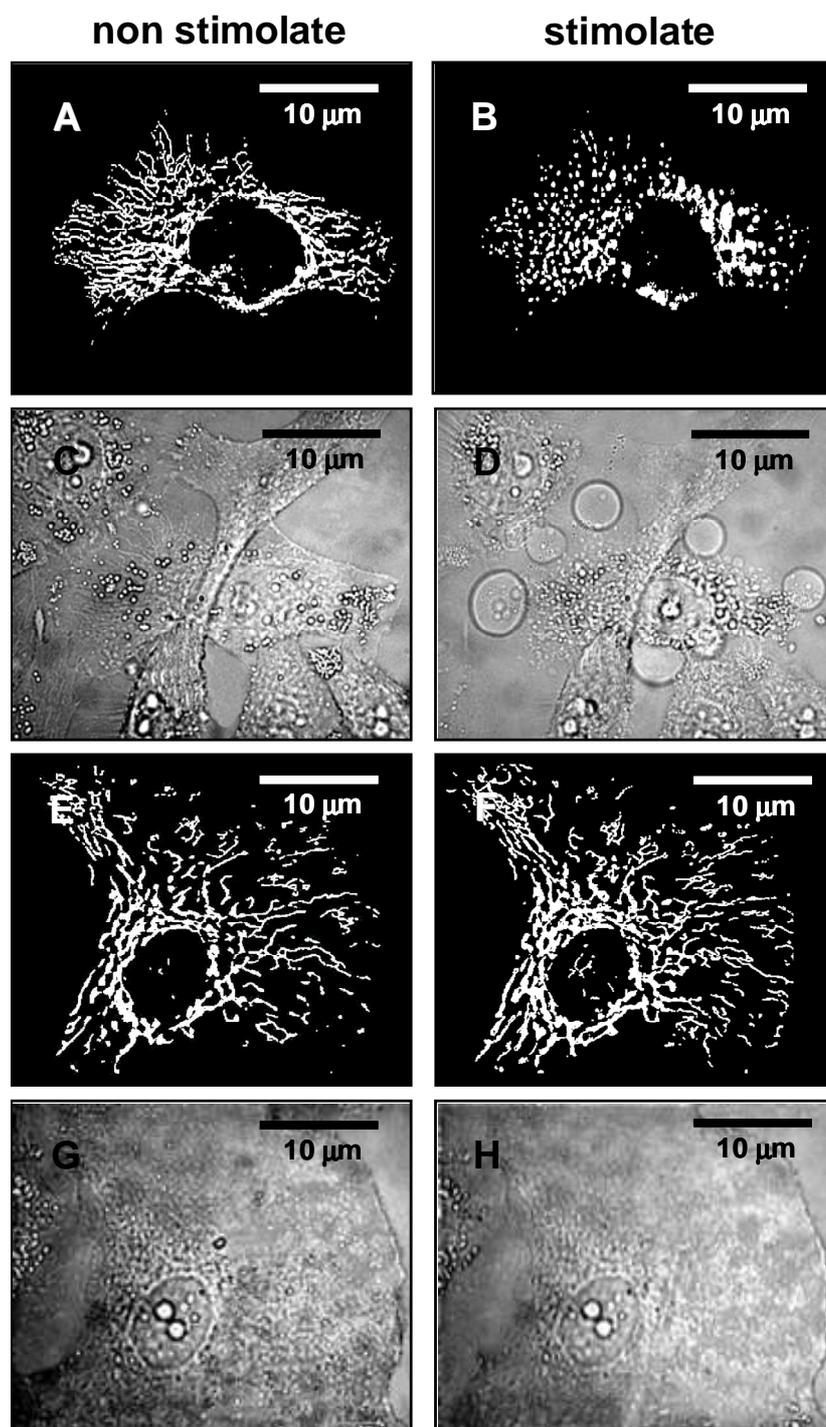


Fig. 16 La stimolazione farmacologica di cellule *HeLa-hP2X₇R* causa frammentazione mitocodriale e rigonfiamenti di membrana. Le cellule *HeLa-hP2X₇R* sono state transfettate transientemente con *hP2X₇R/mtGFP* (A-D) o *pcDNA3.1/mtGFP* (mock) (E-H) in rapporto 3:1 e stimolate con 3 mM ATP. Le immagini sono state acquisite con microscopio Nikon prima (A, C, E e G) e 10 min dopo l'aggiunta di 300 μM BzATP (B, D, F e H) e deconvolute. Fluorescenza: A, B, E e F. Contrasto di fase: C, D, G e H. Percentuale di cellule transfettate con *hP2X₇R*: 58 ± 6 ; percentuale di cellule transfettate con *mtGFP*: 18 ± 3 .

La **Figura 17** mostra la rete mitocondriale di cellule HeLa-hP2X₇R e HeLa-mock marcata con TMRM. L'espressione di hP2X₇R causa un aumento del volume mitocondriale (**A**).

Come mostrato precedentemente per le cellule HEK293-hP2X₇R, l'aggiunta di ATP determina dopo 10-15 minuti, il collasso del $\Delta\Psi_m$ nelle cellule HeLa-hP2X₇R (**B**), mentre ha scarso effetto sul $\Delta\Psi_m$ e sulla morfologia delle cellule di controllo (**D**).

Risultati simili sono stati ottenuti in cellule HeLa-hP2X₇R transfettate con mtGFP, poi caricate con TMRM e stimolate con BzATP (**Figura 18**). In queste cellule, contemporaneamente alla caduta del $\Delta\Psi_{mt}$, si verificano modificazioni della rete mitocondriale che appare frammentata (**B**). Le cellule di controllo invece, sono insensibili alla stimolazione con BzATP (**D**).

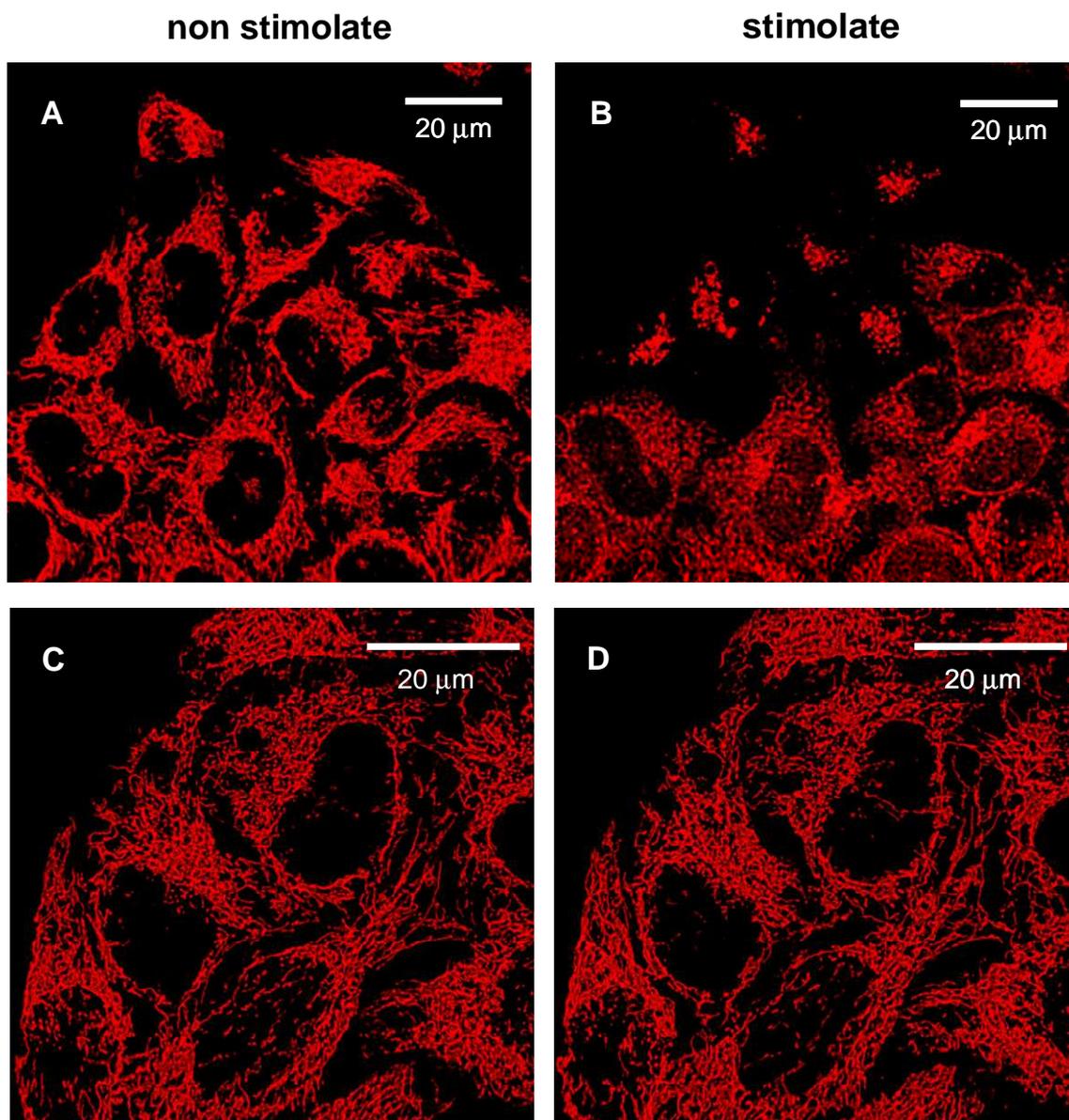


Fig. 17 Risposta delle cellule *HeLa-hP2X₇R* alla stimolazione con ATP. Le cellule sono state transfettate transientemente con *hP2X₇R* (A e B) o con il plasmide vuoto (C e D), caricate con 20 nM TMRM e stimulate con 3 mM ATP (B e D). Le immagini sono state acquisite poco prima, e 15 min dopo l'aggiunta di ATP. L'analisi di 15 vetrini ha mostrato che il $58 \pm 6\%$ delle cellule ha incorporato il plasmide contenente *hP2X₇R* e di queste il $98 \pm 15\%$ ha perso intensità di fluorescenza dopo l'aggiunta dello stimolo.

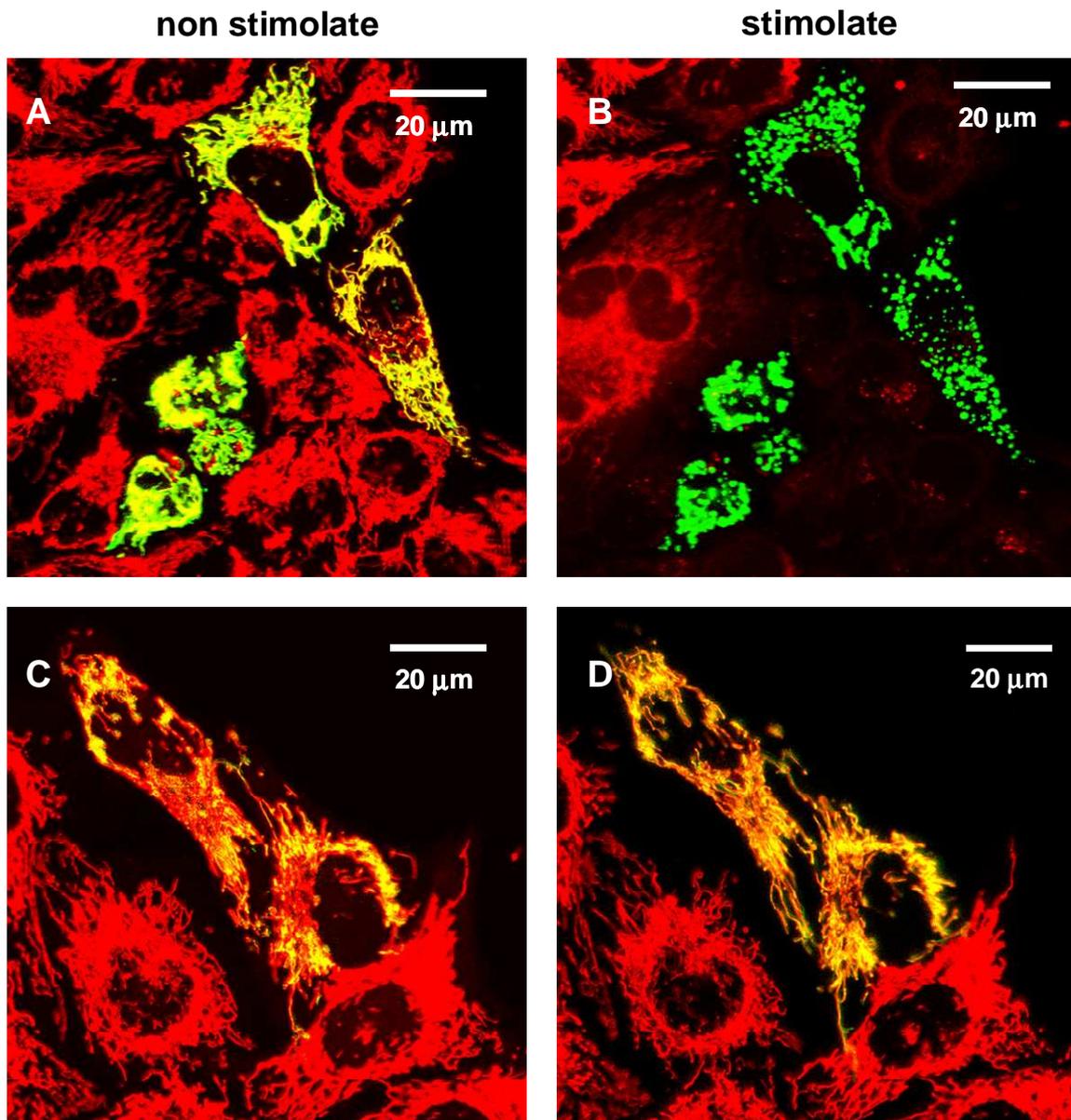


Fig. 18 *Morfologia mitocondriale in cellule HeLa-hP2X₇R.* Le cellule sono state transfettate transientemente con hP2X₇R/mtGFP (A e B) in rapporto 3:1, o con mtGFP (C e D), caricate con 20 nM TMRM e stimolate con 300 μM BzATP (B e D). Le immagini sono state acquisite poco prima e 15 min dopo l'aggiunta di BzATP. L'analisi di 15 vetrini ha mostrato che il $58 \pm 6\%$ delle cellule ha incorporato il plasmide contenente hP2X₇R e di queste il $98 \pm 15\%$ ha perso intensità di fluorescenza dopo l'aggiunta dello stimolo. La percentuale di cellule transfettate con mtGFP è 18 ± 3 .

DISCUSSIONE

Il recettore P2X₇ rappresenta una interessante molecola di membrana per il suo ruolo in due fenomeni opposti della vita cellulare: *proliferazione* (Baricordi *et al.*, 1999) e *morte* (Di Virgilio *et al.*, 2001).

La proliferazione cellulare è mediata da una stimolazione cronica del recettore con basse concentrazioni dell'agonista fisiologico ATP, mentre la morte cellulare è dovuta alla stimolazione acuta dello stesso, per tempi anche brevi ma con elevate concentrazioni di ATP.

L'elevato livello di espressione di P2X₇R in diverse neoplasie, rende questa molecola particolarmente interessante per lo studio della proliferazione delle cellule trasformate e come bersaglio farmacologico nella terapia antineoplastica (Di Virgilio *et al.*, 2001; Di Virgilio and Wiley, 2002). Inoltre, è stato osservato come l'espressione di P2X₇R sia legata al decorso della leucemia linfatica cronica di tipo B (B-CLL) (Adinolfi *et al.*, 2002). In particolare, pazienti affetti dalla forma aggressiva di tale patologia presentano un'elevata espressione ed attività del recettore. Una elevata espressione di P2X₇R è stata dimostrata anche in altri tipi di tumori (Greig *et al.*, 2003; Slater *et al.*, 2004).

Al contrario, nelle cellule microgliali, nei macrofagi e nelle cellule dendritiche, la stimolazione di P2X₇R con elevate concentrazioni di ATP, induce apoptosi accompagnata da caratteristiche modificazioni cellulari come condensazione nucleare, frammentazione del DNA ed attivazione di alcune caspasi (casp-1, -3, -8) (Ferrari *et al.*, 1999).

Questo solleva la questione del meccanismo attraverso il quale il recettore può da un lato promuovere la crescita, dall'altro indurre morte della cellula.

Poiché il coinvolgimento di P2X₇R nella proliferazione cellulare è stato finora dimostrato solo in linfociti B umani transfettati con il cDNA del P2X₇R (Baricordi *et al.*, 1999), ho deciso di analizzare l'attività di tale recettore nella linea cellulare HEK293 (HEK293-h

P2X₇R). Queste cellule risultano un modello cellulare adatto allo scopo in quanto non esprimono il recettore e sono di facile propagazione e transfezione.

I risultati ottenuti hanno dimostrato l'effettivo coinvolgimento del recettore P2X₇ nella proliferazione. L'espressione di P2X₇R è, infatti, in grado di stimolare la proliferazione cellulare in assenza di fattori di crescita esogeni e questo effetto dipende da una stimolazione autocrina/paracrina da parte dell'ATP. La proliferazione in assenza di siero ha confermato l'ipotesi che il recettore P2X₇ sia in grado di mediare un segnale capace di promuovere la crescita ma, probabilmente, solo in condizioni in cui altri fattori più potenti siano assenti.

Gli esperimenti effettuati con oATP o con apirasi hanno permesso di provare come, in assenza di siero, le cellule esprimenti P2X₇R abbiano, a differenza di quelle che non lo esprimono, un vantaggio basato sul rilascio di ATP (*loop* autocrino/paracrino) nello spazio pericellulare.

I dati ottenuti dimostrano inoltre, che le cellule HEK293 che esprimono il recettore presentano una quantità di ATP intracellulare maggiore rispetto a quelle che non lo esprimono, il che permette di ipotizzare che l'espressione di P2X₇R svolga un'azione che promuoverebbe la produzione del suo ligando.

I risultati degli esperimenti eseguiti in assenza di calcio extracellulare hanno dimostrato l'importanza di questo ione nel processo proliferativo. L'ingresso di calcio nella cellula provoca un aumento del potenziale di membrana mitocondriale che incrementa l'attività dei mitocondri con conseguente produzione di ATP.

Inoltre, esperimenti effettuati con la fotoproteina calcio-sensibile aequorina hanno evidenziato una maggior concentrazione di calcio mitocondriale ed un maggiore influsso del catione nel RE delle cellule esprimenti P2X₇R, rispetto alle cellule di controllo (HEK293 mock).

Mediante il trattamento con tapsigargina (inibitore irreversibile delle SERCA, calcio-ATPasi del RE che permettono il riaccumulo del calcio rilasciato) ho rilevato un contenuto di calcio totale reticolare significativamente più elevato nelle HEK293-hP2X₇R probabilmente dovuto ad una maggiore attività delle SERCA. Inoltre, le cellule esprimenti il recettore sono maggiormente sensibili alla stimolazione con carbacolo, agonista muscarinico che determina un aumento del livello di calcio sia del RE che dei mitocondri. Tale incremento è correlato alla maggiore sopravvivenza delle cellule HEK293-hP2X₇R in assenza di siero.

Tuttavia, una stimolazione sostenuta del recettore con elevate dosi di ATP (1-3 mM), determina un rapido collasso del potenziale di membrana dei mitocondri, successiva frammentazione della rete mitocondriale, rigonfiamenti di membrana (*blebs*) e conseguente morte cellulare.

Quindi, da un lato l'espressione del recettore sembra conferire un vantaggio proliferativo alle cellule che lo esprimono, dall'altro rende queste cellule più sensibili all'effetto citotossico dell'ATP.

Dai dati ottenuti emerge come l'attivazione moderata di P2X₇R sia in grado di promuovere la proliferazione. L'aumento della concentrazione di calcio nei mitocondri e nel RE comporta da un lato, l'aumento della produzione di energia sotto forma di ATP, e dall'altro una probabile attivazione delle vie di segnale che stimolano la proliferazione attivata dal nucleotide.

L'attivazione acuta del recettore provoca invece, morte cellulare per apoptosi, pertanto è lecito ritenere che P2X₇R sia un recettore bifunzionale, coinvolto sia nella proliferazione che nella morte cellulare a seconda del grado di attivazione. Questa sua capacità bifunzionale rende il recettore P2X₇, l'ATP e i suoi analoghi, molecole interessanti per lo studio di nuove terapie antitumorali.

La capacità di proliferare in assenza di siero è una caratteristica tipica delle cellule tumorali, quindi l'espressione del recettore P2X₇ potrebbe essere un fattore in grado di conferire un vantaggio selettivo alle cellule tumorali, migliorando la loro capacità di sopravvivenza in un ambiente sfavorevole.

BIBLIOGRAFIA

Abbraccio MP., Burnstock G., *Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors?* 1994. *Pharmacol Ther* 64: 445-475

Adinolfi E., Melchiorri L., Falzoni S., Chiozzi P., Morelli A., Tieghi A., Cuneo A., Castoldi G., Di Virgilio F., Baricordi OR., *P2X₇ receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia,* 2002. *Blood* 99: 706-708

Adinolfi E., Kim M., Young MT., Di Virgilio F., Surprenant A., *Tyrosine phosphorylation of HSP90 within the P2X₇ receptor complex negatively regulates P2X₇ receptors,* 2003. *J Biol Chem* 278: 37344-37351

Adinolfi E., Callegari MG., Ferrari D., Bolognesi C., Minelli M., Wieckowsky MR., Pinton P., Rizzuto R., Di Virgilio F., *Basal activation of the P2X₇ ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth,* 2005. *Mol Biol Cell* 16: 3260-3272

Andersen JP., Vilsen B., *Structure-function relationships of the calcium binding sites of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase,* 1998. *Acta Physiol Scand Suppl* 643: 45-54

Arias J., Alberts AS., Brindle P., Claret FX., Smeal T., Karin M., Feramisco J., Montminy M., *Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor,* 1994. *Nature* 370: 226-229

Arnould T., Vankoningsloo S., Renard P., Houbion A., Ninane N., Demazy C., Remacle J., Raes M., *CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation,* 2002. *Embo J* 21: 53-63

Arredouani A., Guiot Y., Jonas JC., Liu LH., Nenquin M., Pertusa JA., Rahier J., Rolland JF., Shull GE., Stevens M., Wuytack F., Henquin JC., Gilon P., *SERCA3 ablation does not impair insulin secretion but suggests distinct roles of different sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ pumps for Ca²⁺ homeostasis in pancreatic beta-cells,* 2002. *Diabetes* 51: 3245-3253

Avantaggiati ML., Ogryzko V., Gardner K., Giordano A., Levine AS., Kelly K., *Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways,* 1997. *Cell* 89: 1175-1184

Baksh S., Widlund HR., Frazer-Abel AA., Du J., Fosmire S., Fisher DE., DeCaprio JA., Modiano JF., Burakoff SJ., *NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression,* 2002. *Mol Cell* 10: 1071-1081

Barclay J., Patel S., Dorn G., Wotherspoon G., Moffatt S., Eunson L., Abdel'al S., Natt F., Hall J., Winter J., Bevan S., Wishart W., Fox A., Ganju P., *Functional downregulation of P2X₃ receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain,* 2002. *J Neurosci* 22: 8139-8147

Baricordi OR., Ferrarai D., Melchiorri L., Chiozzi P., Hanau S., Chiari E., Rubini M., Di Virgilio F., *An ATP-activated channels is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes*, 1996. *Blood* 87: 682-690

Baricordi OR., Melchiorri L., Adinolfi E., Falzoni S., Chiozzi P., Buell G., Di Virgilio F., *Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor*, 1999. *J Biol Chem* 274: 33206-33208

Baumann O., Walz B., *Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains*, 2001. *Int Rev Cytol* 205: 149-214

Beigi R., Kobatake E., Aizawa M., Dubyak GR., *Detection of local ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase*, 1999. *Am J Physiol* 276: C267-278

Berridge MJ., *The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle*, 2002. *Cell Calcium* 32: 235-249

Blinks JR., Rudel R., Taylor SR., *Calcium transients in isolated amphibian skeletal muscle fibres: detection with aequorin*, 1978. *J Physiol* 277: 291-323

Booth C., Koch GLE., *Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins*, 1989. *Cell* 59: 729-737

Born GV., Kratzer RA., *Source and concentration of extracellular adenosine triphosphate during haemostasis in rats, rabbits and man*, 1984. *J Physiol* 354: 419-29

Brandl CJ., deLeon S., Martin DR., MacLennan DH., *Adult forms of the Ca²⁺ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle*, 1987. *J Biol Chem* 262: 3768-3774

Breckenridge DG., Germain M., Mathai JP., Nguyen M., Shore GC., *Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways*, 2003a. *Oncogene* 22: 8608-8618

Brooks S., *The discovery of aequorin and green fluorescent protein*, 2005. *Journal of Microscopy* 217: 1-2

Buell GN., Chessel IP., Michel AD., Collo G., Salazzo M., Herren S., Gretener D., Grahames C., Kaur R., Kosco-Vilbois MH., Humphrey PPA., *Blockade of human P2X₇ receptor function with a monoclonal antibody*, 1998. *Blood* 92: 3521-3528

Burnstock G., *P2X receptors in sensory neurones*, 2000. *Br J Anaesth* 84: 476-488

Cabrini G., Falzoni S., Forchap S., Pellegatti P., Balboni A., Agostani P., Cuneo A., Castaldi G., Baricordi OR., Di Virgilio F., *A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X₇ receptor of human leukemic lymphocytes*, 2005. *Br J Immunol* 175: 82-89

Caetano MS., Vieira-de-Abreu A., Teixeira LK., Werneck MB., Barcinski MA., Viola JP., *NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte*

activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression, 2002. *Faseb J* 16: 1940-1942

Carafoli E., Brini M., *Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport*, 2000. *Curr Opin Chem Biol* 4: 152-161

Chevet E., Jakob CA., Thomas DY., Bergeron JJ., *Calnexin family members as modulators of genetic diseases*, 1999. *Semin Cell Dev Biol* 10: 473-480

Chrivia JC., Kwok RP., Lamb N., Hagiwara M., Montminy MR., Goodman RH., *Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP*, 1993. *Nature* 365: 855-859

Chudakov D., Lukyanov S., Lukyanov K., *Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging*, 2005. *Trends in Biotechnology* 23: 605-613

Cockcroft S., Gomperts SD., *ATP induces nucleotide permeability in rat mast cells*, 1979. *Nature* 279: 541-542

Corbett EF., Michalak M., *Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum?* 2000. *Trends Biochem Sci* 25: 307-311

Crabtree GR., Olson EN., *NFAT signaling: choreographing the social lives of cells*, 2002. *Cell* 109: Suppl S67-S79

Denlinger LC., Fisetto PL., Sommer JA., Watters JJ., Prabhu U., Dubyak GR., Proctor RA., Bertics PJ., *Cutting edge: the nucleotide receptor P2X₇ contains multiple protein- and lipid interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide*, 2001. *J Immunol* 167: 1871-1876

Denton R., McCormack JM., *On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria*. *FEBS Lett* 119: 1-8

Di Virgilio F., Falzoni S., Chiozzi P., Sanz J., Ferrari D., Buell G., *ATP receptors and giant cell formation*, 1999. *J of leucocyte Biology* 66: 723-726

Di Virgilio F., Borea PA., Illes P., *P₂ receptors meet the immune system*, 2001. *Trends in Pharmacol Sciences* 22: 5-7

Di Virgilio F., Wiley JS., *The P2X₇ receptor of CLL lymphocytes: a molecule with a split personality*, 2002. *Lancet* 360: 1898

Di Virgilio F., *Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X₇ receptor is not the only target*, 2003. *British J of Pharmacology* 140: 441-443

Dixon CJ., Bowler WB., Littlewood-Evans A., Dillon JP., Bilbe G., Sharpe GR., Gallagher JA., *Regulation of epidermal homeostasis through P2Y₂ receptors*, 1999. *Br J Farmacol* 127: 1680-1686

Dode L., Wuytack F., Kools PF., Baba-Aissa F., Raeymaekers L., Brike F., van d, V., Casteels R., Brik F., *cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene*, 1996. *Biochem J* 318: 689-699

Dode L., De GC., Mountian I., Attard M., Town MM., Casteels R., Wuytack F., *Structure of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene. Promoter analysis and alternative splicing of the SERCA3 pre-mRNA*, 1998. *J Biol Chem* 273: 13982-13994

Dolmetsch RE., Lewis RS., Goodnow CC., Healy JL., *Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration*, 1997. *Nature* 386: 855-858

Duchen MR., Surin A., Jacobson J., *Imaging mitochondrial function in intact cells*, 2003. *Methods Enzymol* 361: 353-389

Dubyak GR., De Young MB., *Intracellular Ca²⁺ mobilization activated by extracellular ATP in Ehrlich ascites tumor cells*, 1985. 260: 10653-10661

Dubyak GR., Clifford EE., Humphreys BD., Kertesy SB., Martin KA., *Expression of multiple ATP receptor subtypes during the differentiation and inflammatory activation of myeloid leukocytes*, 1996. *Drug Dev Res* 39: 269-278

el-Moatassim C., Dornand J., Mani JC., *Extracellular ATP increases cytosolic free calcium in T lymphocytes and initiates the blastogenesis of the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated medullary population*, 1987. *Biochim Biophys Acta* 927: 437-444

Erlinge D., *Extracellular ATP: a growth factor for vascular smooth muscle cells*, 1998. *Gen Pharmacol* 31: 1-8

Falzone S., Munerati M., Ferrari D., Spisani S., Moretti S., Di Virgilio F., *The P2Z receptor of human macrophage cells*, 1995. *The J of Clinical Investigation* 95: 1207-1216

Ferrari D., Villalba M., Chiozzi P., Falzone S., Ricciardi-Castagnoli P., Di Virgilio F., *Mouse microglial cells express a plasma membrane pore gated by extracellular ATP*, 1996. *J Immunol* 156: 1531-1539

Ferrari D., Los M., Bauer MK., Vandenabeele P., Wesselborg S., Schulze-Osthoff K., *P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death*, 1999. *FEBS J* 447: 71-75

Ferrari D., La Sala A., Chiozzi P., Morelli A., Falzone S., Girolomoni G., Idzko M., Dichmann S., Norgauer J., Dichmann S., Norgauer J., Di Virgilio F., *The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release*, 2000. *FASEB J* 14: 2466-2476

Ferrari D., Pizzirani C., Adinolfi E., Forchap S., Sitta B., Turchet L., Falzone S., Minelli M., Baricordi OR., Di Virgilio F., *The antibiotic polymyxin B modulates P2X₇ receptor function*, 2004. *J Immunol* 173: 4652-4660

- Gething MJ., Sambrook J.,** *Protein folding in the cell*, 1992. *Nature* 355: 33-45
- Ghaemmaghami S., Huh WK., Bower K., Howon RW, Belle A., Dephoure N., O'Shea EK., Weissmann JS.,** *Global analysis of protein expression in yeast*, 2003. *Cell Nature* 425: 737-741
- Giebler HA., Lemasson I., Nyborg JK.,** *p53 recruitment of CREB binding protein mediated through phosphorylated CREB: a novel pathway of tumor suppressor regulation*, 2000. *Mol Cell Biol* 20: 4849-4858
- Gordon JL.,** *Extracellular ATP: effects, sources and fate*, 1986. *Biochem J* 233: 309-319
- Greig AV., Linge C., Cambrey A., Burnstock G.,** *Purinergic receptors are part of a signaling system for keratinocyte proliferation, differentiation and apoptosis in human fetal epidermis*, 2003. *J Invest Dermatol* 121: 1145-1149
- Gross A., McDonnell JM., Korsmeyer SJ.,** *Bcl-2 family members add the mitochondria in apoptosis*, 1999. *Genes & Development* 13: 1899-1911
- Gu W., Shi XL., Roeder RG.,** *Synergistic activation of transcription by CBP and p53*, 1997. *Nature* 387: 819-823
- Gu BJ., Zhang W., Worthington RA., Sluyter R., Dao-Ung P., Petrou S., Barden JA., Wiley JS.,** *A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor*, 2001. *J Biol Chem* 276: 11135-11142
- Herbette L., Marquardt J., Scarpa A., Blasie JK.,** *A direct analysis of lamellar x-ray diffraction from hydrated oriented multilayers of fully functional sarcoplasmic reticulum*, 1977. *Biophys J* 20: 245-272
- Inesi G., Sagara Y.,** *Specific inhibitors of intracellular Ca²⁺ transport ATPases*, 1994. *J Membr Biol* 141: 1-6
- Inouye S., Tsuji FI.,** *The Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of recombinant protein*, 1994. *FEBS letters* 341: 277-280
- Jacob CA., Chevet E., Thomas DY., Bergeron JJ.,** *Lectins of the ER quality control machinery*, 2001b. *Results Probl Cell Differ* 33: 1-17
- Jeffery J., Kendall JM., Campbell AK.,** *Apoaequorin monitors degradation of endoplasmic reticulum (ER) proteins initiated by loss of ER Ca²⁺*, 2000. *Biochem Biophys Res Commun* 268: 711-715
- Jouaville LS., Pinton P., Bastianutto C., Rutter GA., Rizzuto R.,** *Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long term metabolic priming*, 1999. *Cell Biology* 24: 13807-13812

Kendall JM., Dormer RL., Campbell AK., Targeting aequorin to the endoplasmic reticulum of living cells, 1992. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 1008-1016.

Khakh B., *Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses*, 2001. *Nature Neurosciences* 2: 165-174

Kim M., Yoo OJ., Choe S., *Molecular assembly of the extracellular domain of P2X₂, an ATP-gated ion channel*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 240: 618-622.

Kim M., Spelta V., Sim., North RA., Surprenant A., *Differential assembly of rat purinergic P2X₇ receptor in immune cells of the brain and periphery*, 2001. *J Biol Chem* 276: 23262-23267

King BF., Townsend-Nicholson A., Wildman SS., Thomas T., Spyer KM., Burnstock G., *Coexpressions of rat P2X₂ and P2X₆ subunits in Xenopus oocytes*, 2000. *J Neuro* 20: 4871-4877

Kluck RM., Bossy-Wetzel E., Green DR., Newmeyer DD., *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*, 1997. *Science* 275: 1132-1136

Kroemer G., Reed JC., *Mitochondrial control of cell death*, 2000. *Nat Med* 6: 513-519

Kwok RP., Lundblad JR., Chrivia JC., Richards JP., Bachinger HP., Brennan RG., Roberts SG., Green MR., Goodman RH., *Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB*, 1994. *Nature* 370: 223-226

Lazarowski ER., Boucher RC., Harden TK., *Mechanism of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules*, 2003. *Mol Pharmacol* 64: 785-795

Le KT., Babinski K., Seguela P., *Central P2X₄ and P2X₆ channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor*, 1998. *J Neuro* 18: 7152-715

Lee AG., East JM., *What the structure of a calcium pump tells us about its mechanism*, 2001. *Biochem J* 356: 665-683

Lemoli RM., Ferrari D., Fogli M., Rossi L., Pizzirani C., Forchap S., Chiozzi P., Vaselli D., Bertolini F., Foutz T., Aluigi M., Baccarani M., Di Virgilio F., *Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hemopoietic stem cells in vitro and in vivo*, 2004. *Blood* 104: 1662-1670

Li Q., Qi B., Oka K., Shimakage M., Yoshioka N., Inove H., Hakuva A., Kodama K., Stanbridge EJ., Yutsudo M., *Link of a new type of apoptosis-inducing gene ASY/Nogo-B to human cancer*, 2001. *Oncogene* 20: 3929-3936

Lill NL., Grossman SR., Ginsberg D., DeCaprio J., Livingston DM., *Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators*, 1997. *Nature* 387: 823-827

- Liu LH., Boivin GP., Prasad V. Periasamy M., Shull GE.,** *Squamous cell tumors in mice heterozygous for a null allele of Atp2a2, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 Ca²⁺ pump*, 2001. *J Biol Chem* 276: 26737-26740
- Lytton J., Westlin M., Hanley MR.,** *Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps*, 1991. *J Biol Chem* 266: 17067-17071
- Lytton J., Westlin M., Burk SE., Shull GE., MacLennan DH.,** *Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps*, 1992. *J Biol Chem* 267: 14483-14489
- Lundblad JR., Kwok RP., Laurance ME., Harter ML., Goodman RH.,** *Adenoviral E1A-associated protein p300 as a functional homologue of the transcriptional co-activator CBP*, 1995. *Nature* 374: 85-88
- MacLennan DH., Brandl CJ., Korczak B., Green NM.,** *Amino-acid sequence of a Ca²⁺ + Mg²⁺-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence*, 1985. *Nature* 316: 696-700
- MacLennan DH., Rice WJ., Green NM.,** *The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases*, 1997. *J Biol Chem* 272: 28815-28818
- MacKenzie A., Wilson HL., Kiss-Toth E., Dower SK., North RA., Surprenant A.,** *Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding*, 2001. *Immunity* 15: 825-835
- MacKenzie A., Young MT., Adinolfi E., Surprenant A.,** *Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X₇ receptors*, 2005. *J Biol Chem* 280: 33968-33976
- Matthews I., Colyer J., Mata AM., Green NM., Sharma RP, Lee AG., East JM.,** *Evidence for the cytoplasmic location of the N- and C-terminal segments of sarcoplasmic reticulum (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase*, 1989. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 683-688
- Molinari M., Helenius A.,** *Chaperone selection during glycoprotein translocation in the endoplasmic reticulum*, 2000. *Science* 288: 331-333
- Montero M., Brini M., Marsault R., Alvarez J., Sitia R., Pozzan T., Rizzuto R.,** *Monitoring dynamic changes in free Ca²⁺ concentration in the endoplasmic reticulum of intact cells*, 1995. *EMBO J* 14: 5467-5475
- Morelli A., Chiozzi P., Chiesa A., Ferrari D., Sanz JM., Falzoni S., Pinton P., Rizzuto R., Olson MF., Di Virgilio F.,** *Extracellular ATP causes ROCK 1-dependent bleb formation in P2X₇-transfected HEK293 cells*, 2003. *Mol Biol* 14: 2655-2664
- Mutini C., Falzoni S., Ferrari D., Chiozzi P., Morelli A., Baricordi OR., Collo G., Ricciardi-Castagnoli P., Di Virgilio F.,** *Mouse dendritic cells express the P2X₇ purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation*, 1999. *J Immunol* 163: 1958-1965

- Neal JW., Clipstone NA.,** *Constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts*, 2003. *J Biol Chem* 278: 17246-17254
- Neary JT., Kang Y., Bu Y., Yu E., Akong K., Peters CM.,** *Mitogenic signalling by ATP/P2Y purinergic receptors in astrocytes: involvement of calcium-independent protein kinase C, extracellular signal-regulated protein kinase pathway distinct from the phosphatidylinositol-specific phospholipase C/calcium pathway*, 1999. *J Neurosci* 19: 4211-4220
- Newbolt A., Stoop R., Virginio C., Surprenant A., North RA., Buell G., Rassendren F.,** *Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor)*, 1998. *Science* 273: 15177-15182
- Nicke A., Baumert HG., Rettinger J., Eichele A., Lambrecht G., Mutschler E., Schmalzing G.,** *P2X₁ and P2X₃ receptors from stable trimers: a novel structural motif of ligand-ligand ion channels*, 1998. *EMBO J* 17: 3016-3028
- North RA., Surprenant A.,** *Pharmacology of cloned P2X receptors*, 2000. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 40: 563-580
- North RA.,** *The P2X₃ subunit: a molecular target in pain therapeutics*, 2003. *Curr Opin Investig Drugs* 4: 833-840
- Oshimi Y., Miyazaki O., Oda S.,** *ATP-induced Ca²⁺ response mediated by P2U and P2Y purinoceptors in human macrophages: signalling from dying cells to macrophages*. 1998. *Immunology* 98: 220-227
- Pellegatti P., Falzoni S., Pinton P., Rizzuto R., Di Virgilio F.,** *A novel recombinant plasma membrane-targeted luciferase reveals a new pathway for ATP secretion*, 2005. *Mol Biol Cell* 16:3659-65
- Pizzo P., Zanovello P., Bronte V., Di Virgilio F.,** *Extracellular ATP causes lysis of mouse thymocytes and activates a plasma membrane ion channel*, 1991. *Biochem J* 274: 139-144
- Prasher DC., Erkenrode VK., Ward WW., Prendergast FG., Cormier MJ.,** *Primary structure of the Aequorea Victoria green-fluorescent protein*, 1992. *Gene* 111: 229-233
- Preston SF. and Berlin RD.,** *An intracellular calcium store regulates protein synthesis in Hela cells, but it is not the hormone-sensitive store*, 1992. *Cell Calcium* 13: 302-312
- Radford KM., Virginio C., Surprenant A., North RA., Kawashima E.,** *Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X₂ and P2X₃ receptors*, 1997. *J Neurosci* 17: 6529-6533
- Ralevic V., Burnstock G.,** *Receptors for Purines and Pyrimidines*, 1998. *Pharmacol Rev* 50: 413-492

Ranger AM., Grusby MJ., Hodge MR., Gravallese EM., De la Brousse FC., Hoey T., Mickanin C., Baldwin HS., Glimcher LH., *The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation*, 1998a. *Nature* 392: 186-190

Ranger AM., Hodge MR., Gravallese EM., Oukka M., Davidson L., Alt FW., De la Brousse FC., Hoey T., Grusby M., Glimcher LH., *Delayed lymphoid repopulation with defects in IL-4-driven responses produced by inactivation of NF-Atc*, 1998b. *Immunity* 8: 125-134

Rao A., Luo C., Hogan PG., *Transcription factors of the NFAT family: regulation and function*, 1997. *Annu Rev Immunol* 15: 707-747

Rassendren F., Buell GN., Virginio C., Collo G., North RA., Surprenant A., *The permeabilizing ATP receptor, P2X₇. Cloning and expression of a human cDNAs*, 1997. *J Biol Chem* 272- 5482-5486

Reed JC., *Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies*, 1997. *Semin Hematol* 34: 9-19

Rizzuto R., Simpson AW., Brini M., Pozzan T., *Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin*, 1992. *Nature* 358: 325-327

Rizzuto R., Brini M., Murgia M., Pozzan T., *Microdomains with high Ca²⁺ close to IP₃-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria*, 1993. *Science* 262: 744-747

Rizzuto R., Brini M., Pizzo P., Murgia M., Pozzan T., *Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells*, 1995. *Curr Biol* 5: 635-642

Satterwhite CM., Farrely AM., Bradley ME., *Chemotactic, mitogenic, and angiogenic actions of UTP on vascular endothelial cells*, 1999. *Am J Physiol* 276: H1091-1097

Scaduto RCJr., Grotyohann LW., *Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives*, 1999. *Biophys J* 76: 469-477

Schendel SL., Montal M., Reed JC., *Bcl-2 family proteins as ionchannels*, 1998. *Cell Growth Differ* 5: 372-380

Shimomura O., Johnson FH., Saiga Y., *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*, 1962. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-39

Sitia R., Braakman I., *Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory*, 2003. *Nature* 426: 891-894

Slater M., Danieleto S., Gidley-Baird A., Teh LC., Barden JA., *Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X₇ receptors*, 2004a. *Histopathology* 44: 206-215

Slater M., Danieletto S., Pooley M., Cheng The L., Gidley-Baird A., Barden JA., *Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions,* 2004b. *Breast Cancer Res Treat* 83: 1-10

Smart ML., Gu B., Panchal RG., Wiley J., Cromer B., Williams DA., Petrou S., *P2X₇ receptor cell surface expression and cytolitic pore formation are regulated by a distal C-terminal region,* 2003. *J Biol Chem* 278: 8853-8860

Solini A., Chiozzi P., Falzoni S., Morelli A., Fellin R., Di Virgilio F., *High glucose modulates P2X₇ receptor-mediated function in human primary fibroblasts,* 2000. *Diabetologia* 43: 1248-1256

Solini A., Chiozzi P., Morelli A., Adinolfi E., Rizzo R., Baricordi OR., Di Virgilio F., *Enhanced P2X₇ activity in human fibroblasts from diabetic patients: a possible pathogenetic mechanism for vascular damage in diabetes,* 2004. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1240-1245

Soti C., Csermely P., *Chaperones and aging: role in neurodegeneration and other civilizational diseases,* 2002. *Neurochem Int* 41: 383-389

Sumbilla C., Cavagna M., Zhong L., Ma H., Lewis D., Farrance I., Inesi G., *Comparison of SERCA1 and SERCA2a expressed in COS-1 cells and cardiac myocytes,* 1999. *Am J Physiol* 277: H2381-H2391

Subramanian K., Meyer T., *Calcium-induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores,* 1997. *Cell Biol.* 89: 963-971

Surprenant A., Rassendren FA., Kawashima E., North RA., Buell G., *The cytolitic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇),* 1996. *Science* 272: 735-738

Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H., *Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution,* 2000. *Nature* 405: 647-55

Torres GE., Egan TM., Voigt MM., *Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners,* 1999. *J Biol Chem* 274: 6653-6659.

Tsuda M., Ueno S., Inoue K., *Evidence for the involvement of spinal endogenous ATP and P2X receptors in nociceptive responses caused by formalin and capsaicin in mice,* 1999. *Br J Pharmacol* 128: 1497-1504

Verboomen H., Wuytack F., De SH., Himpens B., Casteels R., *Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca²⁺ pumps and their modulation by phospholamban,* 1992. *Biochem J* 286: 591-595

Vial C., Roberts J., Evans R., *Molecular properties of ATP-gated P2X receptor ion channels,* 2004. *Trends in Pharm Sci* 25: 487-493

Virginio C., MacKenzie A., North RA., Surprenant A., *Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X₇ receptor*, 1999a. *J Physiol* 519: 335-346

Virginio C., MacKenzie A., Rassendren FA., North RA., Surprenant A., *Pore dilation of neuronal P2X receptor channels*, 1999b. *J Physiol* 2: 315-321

von Albertini M., Palmethofer A., Kaczmarek E., Koziak K., Stroka D., Grey ST., Stuhlmeier KM., Robson SC., *Extracellular ATP and ADP activate transcription factor NF-Kappa B and induce endothelial cell apoptosis*, 1998. *BiochemBiophys Res Commun* 248: 822-829

Vonend O., Grote T., Oberhauser V., Von Kugelgen I., Rump LC., *P2Y-receptors stimulating the proliferation of human mesangial cells through the MAPK42/44 pathway*, 2003. *Br J Pharmacol* 139: 1119-1126

Weisman GA., Wang M., Kong Q., Chorna NE., Neary JT., Sun GY., Gonzalez FA., Seye CI., Erb L., *Molecular determinants of P2Y₂ nucleotide receptor function: implications for proliferative and inflammatory pathways in astrocytes*, 2005. *Mol Neurobiol* 31: 169-183

Wiley JS., Chen R., Jamieson GP., *The ATP₄- receptor-operated channel (P2Z class) of human lymphocytes allows Ba²⁺ and ethidium⁺ uptake: inhibition of fluxes by suramin*, 1993. *Arch Biochem Biophys* 305: 54-60

Wiley JS., Gargett CE., Zhang W., Snook MB, Jamieson GP., *Partial agonists and antagonists reveal a second permeability state of human lymphocyte P2Z/P2X₇ channel*, 1998. *Am J Physiol* 275: C1224-1231

Wiley JS., Dao-Ung LP., Li C., Shemon AN., Gu BJ., Smart ML., Fuller SJ., Barden JA., Petrou S., Sluyter R., *An Ile-568 to Asn polymorphism prevents normal trafficking and function of the human P2X₇ receptor*, 2003. *J Biol Chem* 278: 17108-17113

Wuytack F., Dode L., Baba-Aissa F., Raeymaekers L., *The SERCA3-type of organellar Ca²⁺ pumps*, 1995. *Biosci Rep* 15: 299-306

Young HS., Xu C., Zhang P., Stokes DL., *Locating the thapsigargin-binding site on Ca²⁺-ATPase by cryoelectron microscopy*, 2001. *J Mol Biol* 308: 231-240

RINGRAZIAMENTI

“La più perduta delle giornate è quella in cui non si è riso”

Nicolas de Chamfort

Con voi ho riso tanto, da voi ho imparato molto.

Grazie Davide, Elena, Cinzia, Simonetta, Patrizia, Maria, Sylvia, Paola, Dario

Grazie Sara

Grazie Prof. Francesco Di Virgilio

Con riconoscenza e sincera gratitudine,

Giulia