

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA

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

*Caratterizzazione degli effetti mediati dalla
stimolazione dei recettori P2
in cheratinociti e macrofagi umani*

Dott.ssa Sara Gulinelli

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Sandro Grilli

Tutore:

Chiar.mo Prof. Francesco Di Virgilio

*Quello che noi facciamo è solo una goccia nell'oceano,
ma se non lo facessimo l'oceano avrebbe una goccia in meno.*

Madre Teresa di Calcutta

INDICE	pag.
<u>ABBREVIAZIONI</u>	4
<u>PARTE INTRODUTTIVA</u>	
I recettori purinergici	7
I recettori purinergici P1	7
I recettori purinergici P2	8
I recettori P2X	8
Il recettore P2X ₇	12
I recettori P2Y	17
I cheratinociti	22
Il sistema monocito-macrofagico	25
I recettori P2 nei macrofagi	28
Le citochine	33
Caratteristiche generali	34
Funzioni delle citochine	35
Recettori delle citochine	36
Interleuchina 4 (IL-4)	39
Interleuchina 18 (IL-18)	41
Interferone	46
Interferone gamma	47
Le microparticelle	48
L'inflammasoma	52
Lo ione calcio come secondo messaggero	57
Canali calcio a livello della membrana plasmatica	58

Canali a controllo di ligando	59
Canali a controllo di potenziale (VOCCs)	60
Meccanismo di estrusione del calcio	60
Depositi di calcio intracellulari	61
Sistemi tampone per il calcio	63
<u>SCOPO DELLA TESI</u>	64
<u>MATERIALI E METODI</u>	65
Reagenti	65
Colture cellulari	65
Microscopia	66
Purificazione delle microvescicole	67
Misurazione dell'espressione della citochina IL-18	68
Analisi dell'espressione delle proteine tramite Western blot	68
Misurazione delle variazioni di concentrazione del calcio intracellulare	69
Estrazione e quantificazione dell'RNA	71
RT-PCR	72
<u>RISULTATI</u>	74
PARTE PRIMA	74
Cheratinociti	74
Espressione dell'mRNA dei recettori P2 nei cheratinociti umani	74
La stimolazione con nucleoidi extracellulari determina variazioni della concentrazione di calcio intracellulare	75
La stimolazione con nucleotidi extracellulari determina modificazioni morfologiche dei cheratinociti	78
IL-4 e IFN- γ modulano l'espressione dei messaggeri dei sottotipi P2Y ₁ e P2X ₇	80
Le risposte dei recettori P2 non sono modulate dal trattamento con IL-4 e IFN- γ	83
Il pretrattamento dei cheratinociti con IL-4 o IFN- γ non determina modificazioni significative a livello della morfologia cellulare	86

PARTE SECONDA	88
Macrofagi	88
La stimolazione con nucleotidi extracellulari determina modificazioni morfologiche nei macrofagi	88
Importanza del calcio nel rilascio delle microvescicole	91
Il rilascio delle microvescicole avviene anche in salina standard contenente calcio	92
Il rilascio di microvescicole è P2X ₇ -dipendente	93
Le microvescicole contengono la citochina proinfiammatoria IL-18	95
L'assenza di calcio extracellulare riduce la concentrazione di IL-18 nelle vescicole	99
Le microvescicole esprimono il recettore P2X ₇	100
Le microvescicole contengono i componenti dell'inflammasoma	100
<u>DISCUSSIONE</u>	101
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	106
<u>PUBBLICAZIONI</u>	118

ABBREVIAZIONI

aa: aminoacidi

ATP: adenosin trifosfato

$[Ca^{2+}]_c$: concentrazione del calcio citosolico

$[Ca^{2+}]_i$: concentrazione del calcio intracellulare

AcPL: “accessory protein-like”

ADP: adenosin difosfato

AMP: adenosin monofosfato

APAF-1: “apoptosis-activating factor-1”

ATP⁴⁻: ATP in forma tetra anionica

bp: paia di basi

BzATP: 2',3'-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP

cAMP: adenosin monofosfato ciclico

CSF: fattore stimolanti le colonie

DAG: diacilglicerolo

EDTA: acido etilendiamminotetracetico

ELISA: “enzyme-linked immunosorbent assay”

GDP: guanidin difosfato

GM-CSF: “granulocyte macrophage-colony stimulating factor”

ICE: “IL-1 β -converting enzyme” (caspasi-1)

IFN- γ : interferone gamma

IGIF: “interferon-gamma inducing factor”

IL: interleuchina

IL-1Rrp: “IL-1 receptor related protein”

iNOS: nitrossido sintetasi inducibile

IP₃: inositolo trifosfato

LPS: lipopolisaccaride batterico

MGC: cellule giganti multinucleate

MP: microparticelle

NAD: nicotinammide adenin dinucleotide

NADH: nicotinammide adenin dinucleotide ridotto

NADP: nicotinammide adenin dinucleotide fosfato

NADPH: nicotinammide adenin dinucleotide fosfato ridotto

NF- κ B: fattore di trascrizione nucleare- κ B

NK: natural killer

NO: ossido nitrico

oATP: ATP ossidato

PBMC: cellule mononucleate del sangue periferico

PBS: “phosphate buffer saline”

P_i: fosfato inorganico

PKA: protein chinasi A

PKC: protein chinasi C

PLC: fosfolipasi C

PMSF: “phenylmethylsulfonyl fluoride”

PR-3: proteinasi-3

PS: fosfaditilserina

RT-PCR: “reverse transcriptase-polymerase chain reaction”

TF: fattore tissutale

TLR: “Toll-like receptor”

TNF: fattore di necrosi tumorale

TNF- α : fattore di necrosi tumorale alfa

UDP: uridin difosfato

UTP: uridin trifosfato

2MeSATP: 2-methylthioATP

$\alpha\beta$ -metilene-ATP: alfa beta metilene ATP

PARTE INTRODUTTIVA

I RECETTORI PURINERGICI

I recettori purinergici sono recettori di membrana attivati dai nucleotidi extracellulari. Si suddividono in due grosse famiglie P1 e P2 (**Figura 1**).

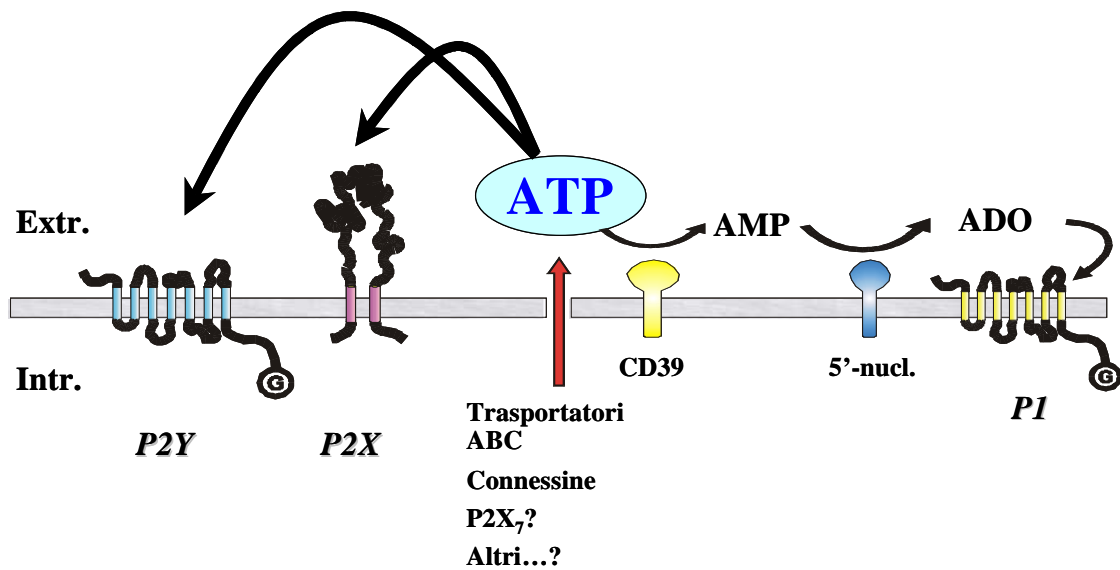


Figura 1) L'ATP prodotto dalla cellula viene rilasciato nell'ambiente extracellulare dove viene sia degradato da enzimi presenti sulla membrana, che utilizzato a livello di diverse classi recettoriali.

I recettori P1

Sono recettori di membrana accoppiati a proteine G, il cui principale agonista è l'adenosina o ADP; questi recettori vengono ulteriormente suddivisi in A₁, A_{2A}, A_{2B} (Ralevic e Burnstock, 1998) e A₃ (Muller, 2001). L'ADP è rilasciata dai tessuti in condizioni di ipossia ed ischemia. Una delle sue funzioni è quella di ridurre l'attività neuronale e quindi il consumo di ossigeno agendo da agente neuroprotettivo. Gran parte di questi effetti sembrano essere mediati dall'attivazione del recettore A₁. Localizzati a livello pre- e post-

sinaptico e sugli assoni, i recettori A₁ riducono il rilascio di neurotrasmettitore, riducendo l'eccitabilità del neurone (Jain et al., 1995).

I recettori P2

Sono recettori di membrana il cui principale agonista è l'ATP (**Figura 1**) e vengono distinti in due sottofamiglie: P2X e P2Y (Abbracchio e Burnstock, 1994).

Ad oggi sono stati clonati 15 sottotipi di recettori P2 molti dei quali hanno una distribuzione tissutale caratteristica.

L'identificazione molecolare dei vari membri della famiglia P2 ha incrementato notevolmente l'interesse per i nucleotidi come messaggeri extracellulari e per i loro effetti biologici in processi come la proliferazione, il differenziamento e la morte cellulare, nonché il rilascio di ormoni, neurotrasmettitori e citochine (Abbracchio e Burnstock, 1998; Di Virgilio et al., 2001). L'espressione stessa dei recettori P2 nelle cellule del sistema immunitario è modulata da citochine infiammatorie e agenti che inducono differenziamento.

I recettori P2X

Si tratta di recettori ionotropici, cioè di recettori la cui attivazione determina l'apertura diretta di canali di membrana selettivi per cationi mono e bivalenti, in grado di determinare l'ingresso nella cellula di Na⁺ e Ca²⁺ e la fuoriuscita di K⁺.

L'azione dei recettori P2X avviene in un tempo stimato intorno ai millisecondi; questi recettori hanno un'affinità per l'ATP in un range μM e mediano una risposta veloce e a breve distanza. Oltre all'ATP, l' $\alpha\beta$ -metilene-ATP rappresenta un buon agonista per questa classe di recettori in quanto risulta essere resistente alla degradazione enzimatica e quindi può essere utilizzato per l'identificazione dei recettori anche *in vivo* (Tsuda et al., 1999).

Sono stati clonati 7 sottotipi di recettori P2X: P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇, che presentano una lunghezza stimata tra 379 (P2X₆) e 595 (P2X₇) aminoacidi (**Tabella 1**).

<i>Sottotipo P2X</i>	<i>numero di aa</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

Tabella 1) I recettori P2X

Sono in generale espressi da cellule eccitabili come neuroni, cellule muscolari lisce e striate. Probabilmente intervengono nella trasmissione sinaptica rapida interneurale nel SNC o nella contrazione muscolare. Si rinvengono comunque anche a livello delle cellule del sistema immunitario, come monociti, macrofagi, dendritiche, timociti e altre cellule linfoidei nelle quali sembrano mediare molteplici risposte tra cui la morte per apoptosi (Pizzo et al., 1991; Chvatchko et al., 1996).

I recettori P2X (**Figura 2**), presentano due domini idrofobici transmembrana (TM), e le porzioni aminoterminale e carbossiterminale si trovano entrambe sul versante citoplasmatico della membrana (Newbolt et al., 1998; Torres et al., 1998). L'estremità aminoterminale della subunità P2X è più corta rispetto a quella carbossiterminale (circa 20-30 residui contro i 28 di P2X₆ e i 242 di P2X₇, rispettivamente). Traslocazioni, delezioni, mutazioni e "splicing" a livello della coda carbossiterminale si ripercuotono in

maniera diversa sulla cinetica, sulla permeabilità e sulla desensitizzazione del canale (Khakh et al., 1999; Smith, 1999).

Il “loop” extracellulare di tutti i recettori P2X contiene 10 residui di cisteina e le subunità P2X sono glicosilate a livello di tre residui di asparagina (N182, N239 e N298), la delezione di almeno due dei tre residui di asparagina porta all’inattivazione del canale ionico (Newbolt et al., 1998; Torres et al., 1998).

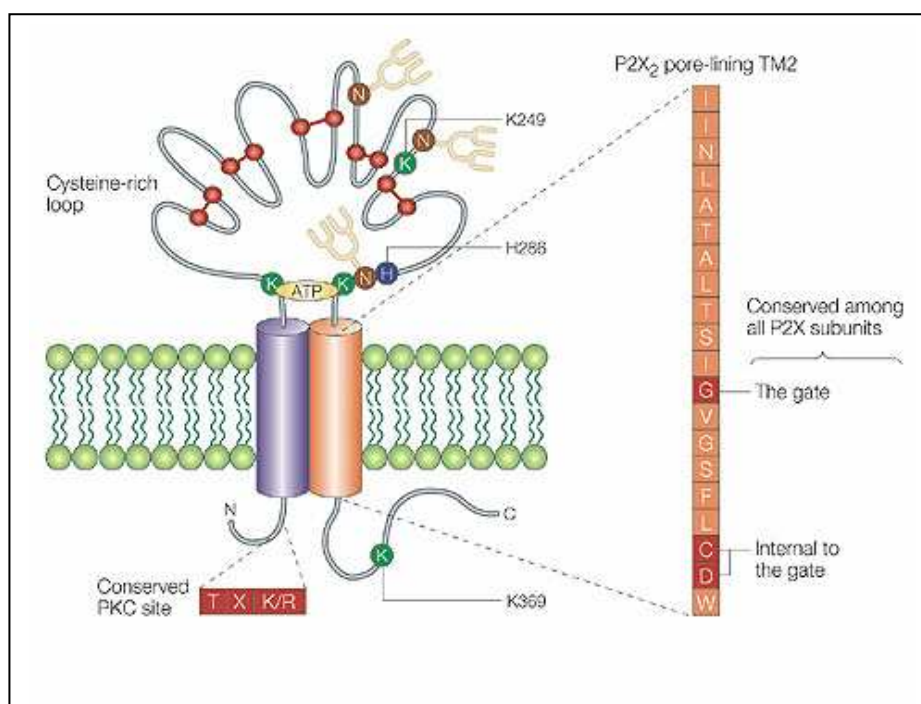


Figura 2) Rappresentazione schematica della subunità P2X. Due regioni transmembrana sono collegate da una porzione extracellulare, in cui sono evidenziati i residui cisteinici che formano ponti disolfuro (in rosso), tre probabili siti di N-glicosilazione (in giallo), il presunto sito di legame all'ATP ed il sito consenso per la protein chinasi C.

I recettori P2X sono formati da più di una subunità a costituire omopolimeri o eteropolimeri (Torres et al., 1999). Le subunità di P2X₂ si assemblano come tetrameri (Kim et al., 1997) mentre quelle di P2X₁ e P2X₃ come trimeri (Nicke et al., 1998). Tutte le subunità P2X contengono nella coda aminoterminale un sito consenso per la protein chinasi C (Thr-X-Lys/Arg) (Boue-Grabot et al., 2000). Si ritiene che il sito di legame per

l'ATP sia localizzato vicino al "loop" extracellulare, ricco di cisteine e che tale sito includa una regione vicino ai residui di lisina alle posizioni 69 e 71 (Ennion et al., 2000; Jiang et al., 2000). Il "loop" extracellulare purificato, ottenuto dal recettore P2X₂ è in grado di legare l'ATP anche se a bassa affinità (Kim et al., 1997).

L'azione dell'ATP sui recettori P2X è stata studiata mediante mutagenesi di alcuni residui (Zhou et al., 1998; Clarke et al., 2000; Nakazawa e Ohno, 1999; Rettinger et al., 2000), indicando che cambiando i residui Lys68, Lys70, Arg292, Arg309 a livello di TM1 e TM2 si ha un potenziamento dell'azione dell'ATP sui recettori P2X umani (Ennion et al., 2000). P2X₂, P2X₄ e P2X₇ hanno almeno due stati di apertura (I₁ e I₂) ai quali corrispondono permeabilità distinte. Lo stato I₁ è relativamente impermeabile a cationi organici di elevate dimensioni e nel recettore P2X₇ questo diametro è di circa 0.9 nm (Surprenant et al., 1996). I recettori P2X passano dallo stato chiuso a I₁ in pochi millisecondi dopo il legame con l'ATP e successivamente si ha la formazione di un poro (I₂) di 3-5 nm in un tempo di un centinaio di millisecondi.

I recettori P2X sono espressi abbondantemente nelle cellule eccitabili e svolgono un ruolo importante come mediatori della neurotrasmissione eccitatoria a livello delle terminazioni purinergiche sia nel sistema nervoso centrale che periferico. L'mRNA per P2X₁ è espresso prevalentemente nelle cellule muscolari, ma il recettore è stato rinvenuto anche nelle piastrine. Il P2X₃ è espresso nei principali neuroni afferenti, ossia in neuroni sensoriali nocicettivi di piccolo diametro della radice dorsale e dei gangli trigemino e nodoso; esperimenti *in vivo* hanno attribuito a P2X₃ e al polimero P2X_{2/3} un ruolo nella segnalazione del dolore infiammatorio cronico e del dolore neuropatico (Barclay et al., 2002). P2X₄ e P2X₆ sono espressi ad alti livelli nel cervello, mentre l'espressione del P2X₇ è elevata nel sistema immunitario (monociti, macrofagi, microglia, cellule dendritiche) (Burnstock, 2000; North, 2003).

Il recettore P2X₇

Si tratta dell'ultimo recettore clonato della sottofamiglia P2X. Questo recettore differisce dagli altri sottotipi per la presenza di un lungo dominio citoplasmatico carbossiterminale, di circa 200 aminoacidi. La lunga coda citoplasmatica è indispensabile per la transizione da canale a poro, come dimostrato da esperimenti condotti con il recettore troncato nella posizione 418 ed espresso in cellule HEK293 (Surprenant et al., 1996).

Il recettore è attivato dall'ATP, in particolare nella forma tetra anionica (ATP⁴⁻) e media l'apertura:

- di un canale, se la stimolazione è di breve durata e a basse concentrazioni di ATP,
- di un poro di membrana non selettivo, per stimolazioni prolungate o sostenute con elevate concentrazioni di ATP. La formazione del poro permette il passaggio di ioni, nucleotidi ed altre molecole idrofiliche di basso peso molecolare, normalmente impermeabili attraverso la membrana cellulare intatta (**Figura 3**).

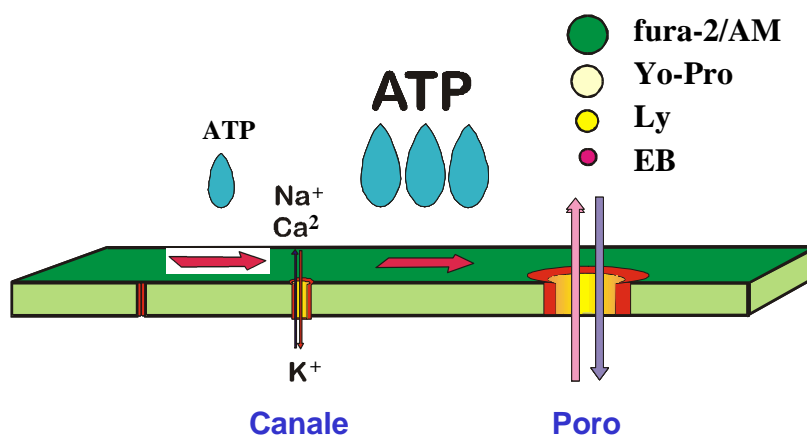


Figura 3) Transizione da canale a poro del recettore P2X₇. Elevate concentrazioni di ATP permettono al canale P2X₇ di diventare permeabile (poro) a molecole di dimensioni fino a 900 Da, come gli indicatori fluorescenti fura-2, Yo-Pro, giallo lucifero (Ly) ed etidio bromuro (EB).

Il recettore P2X₇ non va incontro a desensitizzazione, pertanto il poro rimane aperto finché è presente ATP nell'ambiente extracellulare; inoltre la sua attivazione è reversibile, quindi

il poro si richiude non appena il nucleotide viene rimosso. Per questo motivo una prolungata attivazione di P2X₇ può essere causa di morte cellulare.

Studi condotti su cellule umane (HEK293) trasfettate con P2X₇ di ratto, suggeriscono che l'attivazione massimale di questo recettore causi una dilatazione del canale ionico da un minimo di 0,8 nm ad un massimo di 3-5 nm (Buell et al., 1996; Rassendren et al., 1997; Virginio et al., 1999).

P2X₇ è espresso da numerosi tipi cellulari quali neuroni, cellule dendritiche (Mutini et al., 1999; Ferrari et al., 2000) e microgliali (Ferrari et al., 1996), fibroblasti (Solini et al., 2000), linfociti (Wiley et al., 1998) e cellule endoteliali (von Albertini et al., 1998).

L'RNA messaggero per il recettore aumenta durante il differenziamento dei monociti a macrofagi. Risposte P2X₇-dipendenti sono valutabili infatti già 24 ore dopo la semina dei monociti (Dubyak et al., 1996). Mediatori infiammatori quali IFN- γ , TNF- α e l'LPS determinano un aumento dell'espressione di P2X₇ (Falzoni et al., 1995; Dubyak et al., 1996), suggerendo un coinvolgimento del recettore nelle infezioni.

Il recettore P2X₇ è altamente polimorfico; Wiley e collaboratori hanno identificato negli ultimi anni, quattro sostituzioni amminoacidiche che ne causano una diminuita funzionalità o la perdita di funzionalità:

- la sostituzione, a livello dell'estremità C-terminale del recettore, in posizione 357, di una treonina con una serina (T357S), determina una diminuzione del 50% della funzionalità del recettore in linfociti e monociti isolati da soggetti eterozigoti, mentre la funzione del P2X₇ è quasi nulla in cellule di individui omozigoti (Shemon et al., 2006).
- La sostituzione dell'acido glutammico in posizione 496 con Ala (E496A) che sembra essere importante per la formazione del poro del P2X₇ (Gu et al., 2001).
- La sostituzione, in posizione 568, di isoleucina con asparagina (I568N) blocca il normale "trafficking" ed espressione in membrana del recettore (Wiley et al., 2003).

- La sostituzione, in posizione 307, di glutammina (un amminoacido non carico) con arginina, altamente carica (R307Q), determina la perdita di funzione del recettore poiché impedisce il legame dell'ATP al dominio extracellulare del recettore (Gu et al., 2004).

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

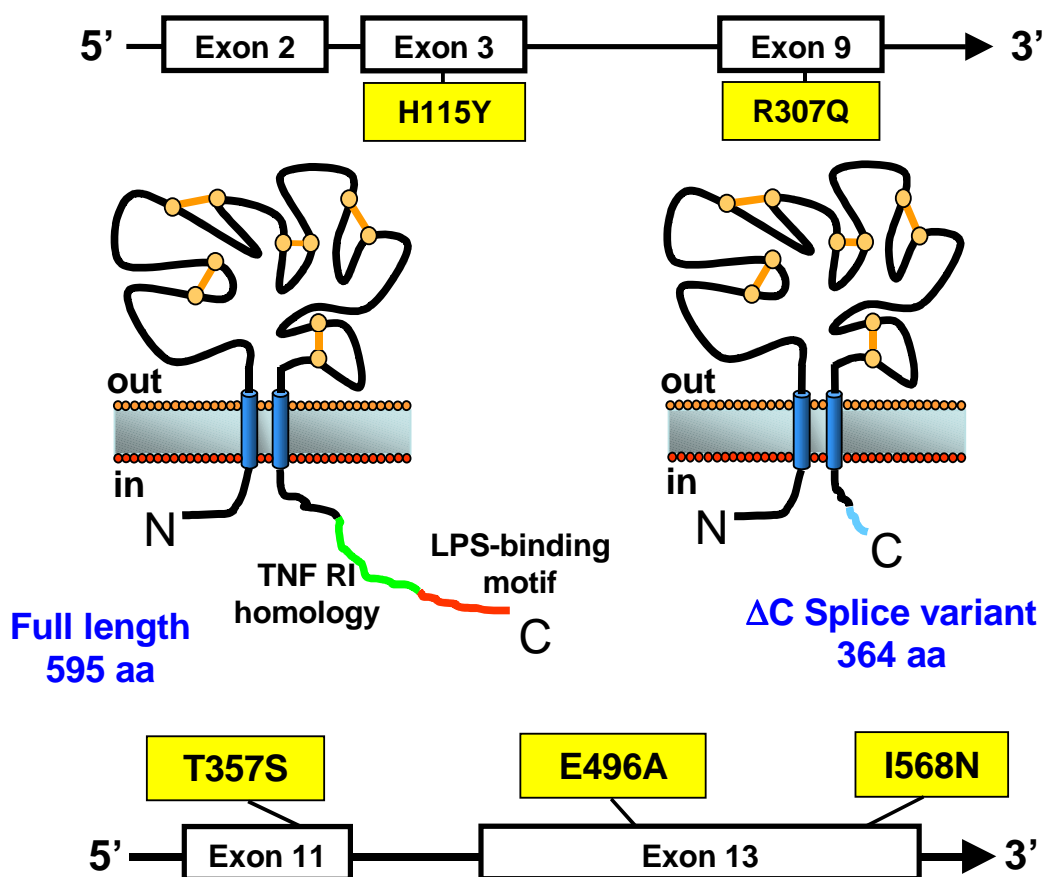


Figura 4) Struttura del recettore P2X₇ nella forma intera e troncata. Il recettore P2X₇ nella forma intera (a sinistra, 595 aa) presenta nella coda C-terminale un sito di omologia con la sequenza per il recettore di TNF (verde) e un sito di legame per l'LPS (rosso), che mancano nella forma troncata del recettore (a destra, 364 aa). Nella figura sono riportati anche i polimorfismi del recettore, localizzati negli esoni corrispondenti (in giallo).

Il recettore P2X₇ è espresso nei macrofagi, nelle cellule dendritiche umane (Surprenant et al., 1996) e ad elevati livelli in linfociti B isolati dal sangue periferico di pazienti affetti da leucemia linfocitaria cronica. Nei linfociti B e T umani (Baricordi et al., 1996) la stimolazione con ATP induce flussi Na⁺ e Ca²⁺ ed un aumento della permeabilità di membrana all'etidio bromuro ma non al propidio (Wiley et al., 1993), facendo ritenere che si formi un poro di dimensioni minori rispetto a quello che si rinviene in altri tipi cellulari (Wiley et al., 1993; Ferrari et al., 1994).

L'espressione di P2X₇ è modulata durante il differenziamento cellulare e dal trattamento con citochine. Soltanto il 15% dei monociti isolati dal sangue periferico esprimono il recettore, ma durante il differenziamento in coltura la percentuale aumenta al 40-60% (Hickman et al., 1994). L'espressione del recettore è incrementata dal trattamento con interferone-gamma (IFN- γ) o concanavalina A (Con A) (Falzoni et al., 1995). Nella linea monocito-macrofagica THP-1 l'effetto sinergico di più stimoli infiammatori come LPS ed IFN- γ provoca un aumento dell'mRNA del recettore P2X₇ e una diminuzione del P2X₁ (Dubyak et al., 1996; Humphreys e Dubyak, 1998). L'incremento del trascritto di P2X₇ si associa anche ad un aumento della sensibilità all'ATP (Falzoni et al., 1995).

La stimolazione dal recettore P2X₇ induce, inoltre, l'attivazione dell'enzima ICE (interleukin-1 β -converting enzyme o caspasi-1), una cistein proteasi in grado di liberare proteoliticamente la forma matura della citochina IL-1 β (17 kDa).

Il recettore P2X₇ può anche mediare segnali di proliferazione. E' noto da diversi anni che l'ATP agisce come mitogeno in linee osteoblastiche MC3T3-E1 (Shimegi, 1996) ed in cellule del mesangio glomerulare (Schulze-Lohoff et al., 1992; Ishikawa et al., 1994).

In macrofagi murini, si è dimostrato che l'effetto citosolico dell'ATP extracellulare è mediato dal recettore P2X₇; la stimolazione di queste cellule con ATP extracellulare provoca un aumento drammatico della permeabilità di membrana a molecole idrofiliche

extracellulari, retrazione degli pseudopodi e lisi cellulare. La morte cellulare è in genere dovuta a lisi colloidale-osmotica, ma è anche accompagnata dalla condensazione e degradazione del DNA in frammenti nucleosomali, caratteristica tipica dell'apoptosi.

Il recettore P2X₇ ha un ruolo nel rilascio dell'IL-1 β e dell' IL-18.

Macrofagi umani e murini, e cellule della microglia pretrattate con LPS e successivamente stimulate con ATP, rilasciano grandi quantità di IL-1 β nella forma matura con numerosi effetti proinfiammatori (Perregaux et al., 1994). L'effetto dell'ATP extracellulare, mediato dal recettore P2X₇, consiste nell'attivazione dell'enzima ICE in grado di liberare proteoliticamente la forma matura della citochina (17 kDa). Ulteriore conferma del coinvolgimento di tale recettore nel rilascio dell'IL-1 β , proviene da esperimenti in cui si dimostra la scarsa produzione di IL-1 β matura in cellule selezionate per la loro resistenza agli effetti dell'ATP extracellulare (perché non esprimono il recettore P2X₇ e in cellule pretrattate con ATP ossidato) (Ferrari et al., 1997).

Le funzioni del P2X₇ sono state studiate a lungo in molteplici tipi cellulari come cellule dendritiche umane e di topo, e hanno messo in evidenza come questi recettori mediano il rilascio di citochine e si è ipotizzato un loro ruolo nella presentazione dell'antigene (Mutini et al., 1999). Essendo l'espressione del P2X₇ estremamente elevata nelle cellule dendritiche, non sorprende che siano particolarmente sensibili all'attività citotossica dell'ATP (Nihei et al., 2000; Coutinho-Silva et al., 1999). Il recettore P2X₇, infatti, non va incontro a desensitizzazione, pertanto il poro rimane aperto finché è presente ATP nell'ambiente extracellulare; inoltre la sua attivazione è reversibile, quindi il poro si richiude non appena il nucleotide viene rimosso. Per questo motivo una prolungata attivazione del P2X₇ può essere causa di morte cellulare. La stimolazione con ATP induce le caratteristiche modificazioni cellulari della morte per necrosi, ma anche di quella per

apoptosi: condensazione nucleare, frammentazione del DNA e attivazione di caspasi-1, -3 e -8 in cellule microgliali (Ferrari et al., 1999; Sanz e Di Virgilio, 2000).

Una breve attivazione del recettore P2X₇ porta all'esposizione reversibile di fosfatidilserina (PS) sulla membrana (MacKenzie et al., 2001). L'esposizione di PS è un processo rapido e Ca²⁺-dipendente che, accompagnato da disgregazione delle proteine del citoscheletro, formazione di evaginazioni della membrana plasmatica e rigonfiamento dei mitocondri, caratterizza quella fase di risposta cellulare all'attivazione del P2X₇ definita come pseudoapoptosi (MacKenzie et al., 2005). L'esposizione di PS precede un altro interessante fenomeno osservato in cellule THP-1 e HEK293 transfettate con il recettore: il rilascio di microvescicole contenenti la citochina proinfiammatoria IL-1 β (MacKenzie et al., 2001). La stimolazione prolungata del recettore causa invece l'attivazione Ca²⁺-indipendente della chinasi ROCK-I (Morelli et al., 2003) e il rilascio di citocromo c dai mitocondri, eventi responsabili della morte cellulare per apoptosi (MacKenzie et al., 2005).

I recettori P2Y

I recettori P2Y presentano una topologia caratterizzata da 7 domini transmembrana di 328-379 aa per un peso molecolare pari a 41-53 kDa dopo glicosilazione.

La breve estremità aminoterminale si trova nell'ambiente extracellulare mentre quella carbossiterminale è citosolica (**Figura 5**).

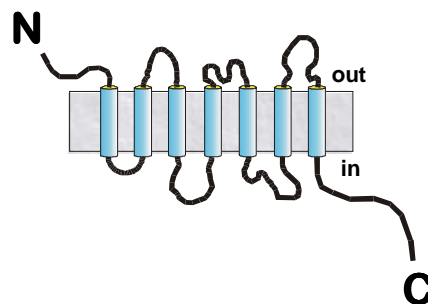


Figura 5) Rappresentazione schematica del recettore P2Y.

Ad oggi, sono stati clonati 8 sottotipi appartenenti a questo gruppo, denominati: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄.

Sono stati individuati in cellule quali epitelioцити, endotelioцити, cellule muscolari striate e lisce, neuroni, fibroblasti, monociti, macrofagi, linfociti T attivati. Tali recettori sono attivati da basse concentrazioni di ATP (in un range nM) e il legame con l'ATP induce una cascata di secondi messaggeri che amplificano e prolungano la durata del segnale da un centinaio di millisecondi fino ad alcuni secondi. Queste caratteristiche rendono i recettori P2Y adatti ad una funzione neuromodulatoria perché possono percepire bassi livelli di ATP che possono essere raggiunti anche ad elevata distanza dal sito di rilascio.

Il sottotipo P2Y è associato a proteine G; il legame al recettore da parte dei nucleotidi extracellulari determina l'attivazione di proteine G, della fosfolipasi C con conseguente formazione di inositolo 3 fosfato (IP₃) e diacilglicerolo (DAG). Ciò è accompagnato da rilascio di calcio dai depositi intracellulari che porta, di conseguenza, ad un aumento della concentrazione di calcio libero citosolico. La via di trasduzione del segnale include inoltre protein chinasi C e fosfolipasi A₂ (Ralevic e Burnstock, 1998) (**Figura 6**).

I recettori P2Y differiscono dalle altre famiglie di recettori accoppiate a proteine G per un'elevata eterogeneità nella sequenza aminoacidica.

Il terzo "loop" intracellulare e la porzione carbossiterminale, che sono molto importanti per l'interazione con proteine G accoppiate ad altre proteine G associate a recettori (Wess, 1998), variano molto tra i diversi sottotipi (Robaye et al., 1997).

I recettori P2Y sono ampiamente distribuiti, in particolare i sottotipi P2Y₂ e P2Y₁₁ sembrano essere frequentemente espressi in cellule immunitarie (Di Virgilio et al., 2001). I recettori P2Y espressi nei macrofagi, monociti, linfociti e nei leucociti polimorfonucleati hanno le stesse proprietà funzionali dei recettori P2Y caratterizzati in cellule non immunitarie.

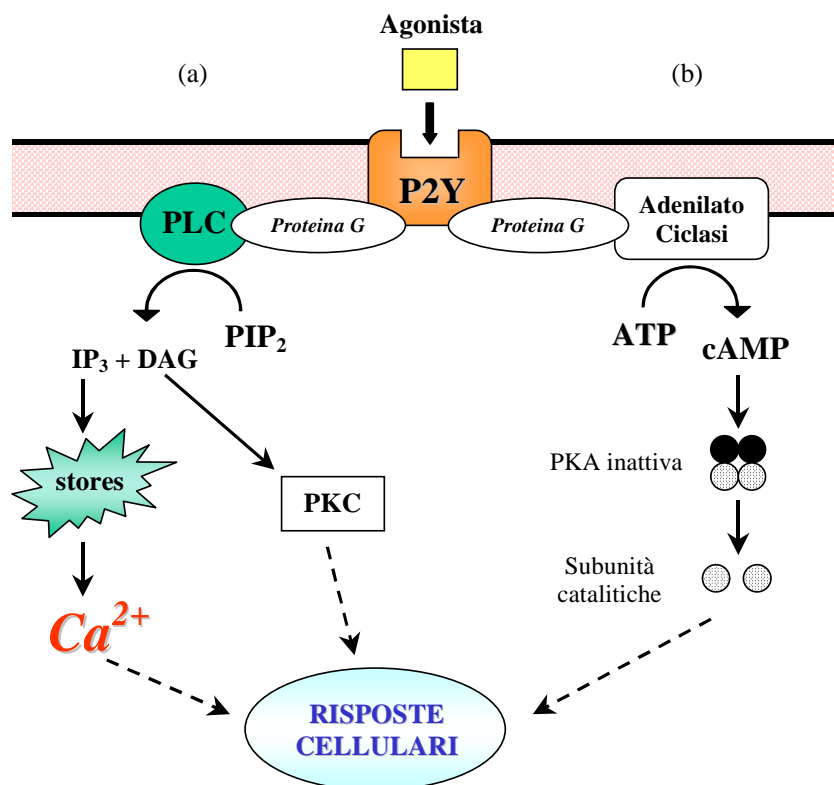


Figura 6) Vie di trasduzione del segnale attivate dai recettori P2Y. (a) L'attivazione di PLC stimola la produzione di IP₃, che induce il rilascio di Ca²⁺ dai depositi intracellulari, e di diacilglicerolo (DAG), che attiva la protein chinasi C (PKC). (b) L'attivazione dell'adenilato ciclasi genera cAMP, che attiva la PKA. L'aumento del Ca²⁺ citosolico e l'attivazione di PKA e PKC mediano le risposte cellulari dovute all'attivazione dei recettori P2Y.

I recettori P2Y sembrano essere variabilmente espressi durante la differenziazione leucocitaria, come dimostrato da studi condotti in mieloblasti e promielociti/promonociti o nelle linee cellulari monocito/macrofagiche HL60 e THP-1 (Dubyak et al., 1996).

I dati ottenuti tramite RT-PCR mostrano che i timociti murini esprimono i P2Y₁ e P2Y₂ e subiscono il rilascio di calcio da depositi intracellulari accompagnato da un incremento della permeabilità di membrana ai cationi esterni, in seguito al trattamento con ATP (Chavatchko et al., 1996). Altri studi hanno mostrato come in cellule dendritiche umane, l'ATP rappresenti uno stimolo chemiotattico, stimolando presumibilmente recettori del sottotipo P2Y.

I monociti isolati dal sangue periferico esprimono recettori P2Y.

L'attivazione dei recettori P2Y induce un aumento dell'espressione delle molecole di adesione, causa il rilascio di enzimi lisosomiali e induce produzione di anione superossido; inoltre, grazie alla capacità di attivare la fosfolipasi A₂, provoca l'accumulo di mediatori dell'infiammazione derivati dall'acido arachidonico.

In fagociti mononucleati, l'attivazione di tali recettori, induce un'ampia varietà di risposte che vanno dalla sensibilizzazione delle cellule effettrici a successivi stimoli infiammatori, alla loro completa attivazione metabolica (Dubyak e el-Moatassim, 1993). Neutrofili ed eosinofili esprimono recettori P2Y, nei quali inducono aumenti della $[Ca^{2+}]_i$, riorganizzazione dell'actina e stimolazione dell'enzima NADPH ossidasi (Saito et al., 1991; Dichmann et al., 2000).

I recettori P2Y sono attivati da diversi nucleotidi. Studi di mutagenesi dei recettori P2Y hanno dimostrato l'importanza dei residui amminoacidici presenti nelle regioni transmembrana 6 e 7 nel determinare la potenza e specificità dell'agonista (Erb et al., 1995). L'ADP rappresenta l'agonista preferenziale di P2Y₁, P2Y₁₂ e P2Y₁₃; ATP e UTP sono equipotenti nell'attivazione di P2Y₂, mentre UTP e UDP sono agonisti preferenziali di P2Y₄ e P2Y₆, rispettivamente; P2Y₁₁ è attivato solo da ATP. L'ultimo recettore P2Y clonato, il P2Y₁₄, presenta una farmacologia diversa dagli altri P2Y, infatti ha come agonista l'UDP-glucosio (Chambers et al., 2000) (**Tabella 2**).

P2Y₁ è ampiamente espresso, essendo stato identificato nelle piastrine, nel cuore, tessuto connettivo, sistema immunitario e tessuto nervoso. P2Y₁ svolge un ruolo importante nell'aggregazione delle piastrine; la mancanza di questo recettore, *in vivo*, prolunga il tempo di sanguinamento e protegge da tromboembolia ADP-dipendente (Fabre et al., 1999). L'espressione di P2Y₁ e P2Y₂ nelle cellule muscolari lisce e nell'endotelio vascolare induce vasodilatazione (Ralevich e Burnstock, 1998).

<i>Sottotipo P2X</i>	<i>numero di aa</i>	<i>agonista preferenziale</i>
P2Y ₁	362	ADP
P2Y ₂	373	UTP, ATP
P2Y ₄	352	UTP
P2Y ₆	379	UDP
P2Y ₁₁	371	ATP
P2Y ₁₂	342	ADP
P2Y ₁₃	334	ADP
P2Y ₁₄	?	UDP-glucosio

Tabella 2) I recettori P2Y.

Il recettore P2Y₄ è espresso nella placenta, mentre risulta poco espresso nel sistema vascolare. Il messaggero di P2Y₆ si rinviene in polmone, cuore, aorta, milza, placenta timo e cervello (Ralevic e Burnstock, 1998). Il recettore P2Y₁₁ è espresso in milza, intestino, miocardio, cellule dendritiche e macrofagi (Communi et al., 1997a/b; Hou et al., 1999; Berchtold et al., 1999); è inoltre espresso in linee cellulari quali HL-60 (leucemia mieloblastica acuta indifferenziata), nella quale induce differenziamento granulocitario (Communi et al., 2000; van der Weyden et al., 2000). P2Y₁₂ è espresso abbondantemente nelle piastrine, nei linfociti e ad un livello minore nel cervello (Hollopeter et al., 2001), mentre P2Y₁₃ si trova in modo predominante in milza e cervello, ma anche nei linfonodi e nel midollo osseo (Communi et al., 2001). Il recettore P2Y₁₄ è espresso soprattutto in placenta, tessuto adiposo, stomaco e intestino, bassi livelli di espressione sono stati rilevati anche in cervello, milza, polmone e cuore (Chambers et al., 2000). L'attivazione di questo recettore media la chemiotassi in una popolazione di cellule ematopoietiche del midollo osseo (Lee et al., 2003).

I CHERATINOCITI

I cheratinociti sono stratificati in un epitelio squamoso e costituiscono la maggiore popolazione di cellule epidermiche della pelle, ma si trovano anche a livello delle mucose, degli epiteli orali, esofageo, corneale, congiuntivale e genitale.

Le caratteristiche della superficie cutanea dipendono essenzialmente da una corretta proliferazione e differenziazione dei cheratinociti, che è soggetta a fine regolazione.

Il risultato terminale della differenziazione dei cheratinociti è la formazione dello strato corneo in cui i cheratinociti anucleati (corneociti), ricchi di componenti proteiche altamente stabilizzate, sono immersi e “cementati” in una matrice lipidica estremamente compatta (**Figura 7**). Per queste caratteristiche lo strato corneo costituisce una formidabile barriera chimico-fisica che regola le perdite di acqua e impedisce alle sostanze esogene di penetrare la cute.

I cheratinociti hanno la proprietà di iniziare e regolare le risposte infiammatorie cutanee, in quanto sono in grado di produrre in maniera altamente controllata una grande varietà di molecole pro- e anti-infiammatorie in risposta ad una vasta serie di stimoli sia esogeni che endogeni.

In presenza di una barriera epidermica impropria i cheratinociti sono indotti a produrre e rilasciare nel distretto epidermico, una serie di mediatori chimici che tendono a ripristinare uno strato corneo perfettamente funzionale, stimolando la proliferazione cellulare e le sintesi lipidiche. Tra queste sostanze vi sono fattori di crescita quali il “nerve growth factor”, il “trasforming growth factor- α ”, l’anfiregulina; citochine come IL-1, il “tumor necrosis factor- α ” (TNF- α), il “granulocyte macrophage colony-stimulating factor” (GM-CSF); chemochine come IL-8. Alcune di queste sostanze (IL-1, TNF- α e GM-CSF), sono potenti iniziatori dell’infiammazione, e insieme alle chemochine forniscono un valido richiamo per molte popolazioni di leucociti dal sangue periferico.

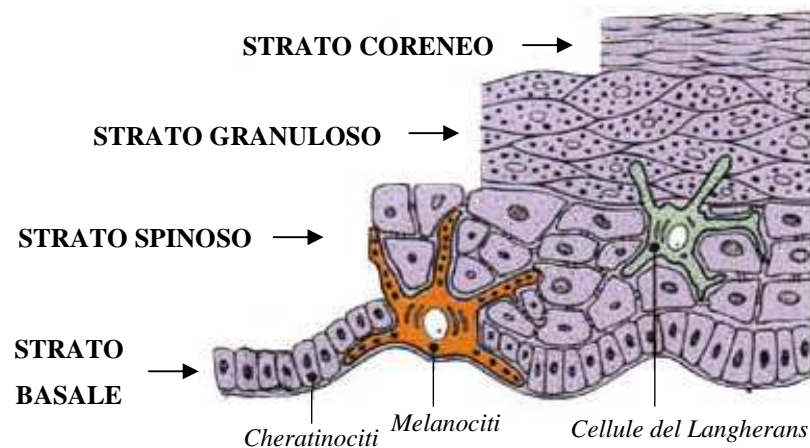


Figura 7) Rappresentazione schematica dell'epidermide. L'epidermide è un epitelio di rivestimento pavimentoso composto, cheratinizzato e di vario spessore. Consiste di vari strati, ciascuno formato da uno o più piani di cellule che procedendo dal derma verso la superficie sono: strato basale o germinativo, strato spinoso, strato granuloso e strato corneo. Ogni strato presenta delle peculiarità strutturali e funzionali. Il principale contingente cellulare dell'epidermide è costituito dai cheratinociti, cioè dalle cellule che, generate nello strato basale, possono differenziarsi e in larga parte effettivamente si differenziano in cellule dello strato corneo. Popolazioni minori, complessivamente intorno al 10-15% delle cellule epidermiche sono rappresentate da altri tipi cellulari, distinti per origine, funzione e destino: i melanociti, le cellule di Langerhans, le cellule di Merkel, i linfociti.

I cheratinociti giocano un ruolo importante nell'indurre e nel perpetuare le reazioni infiammatorie della pelle attraverso il rilascio di citochine e la risposta ad esse. Mentre a riposo i cheratinociti producono alcune citochine costitutivamente, una varietà di stimoli ambientali, come ad esempio promotori tumorali, UV, agenti chimici, possono indurre il rilascio di citochine infiammatorie (IL-1 e TNF- α), chemiochine e citochine che promuovono la crescita (IL-6; GM-CSF, TGF- α) (Kupper et al., 1986; Kock et al., 1990). Di tutte le citochine prodotte dai cheratinociti solo IL-1 α e β , e TNF- α attivano un sufficiente numero di meccanismi effettori in grado di indurre un'inflammatione cutanea indipendente (Kupper, 1986).

La produzione di citochine da parte dei cheratinociti ha molteplici conseguenze sia per la migrazione delle cellule, sia a livello del sistema immunitario (in quanto vengono così influenzati proliferazione e differenziazione dei cheratinociti), sia sulla produzione di altre citochine da parte degli stessi.

IL-6 stimola la proliferazione dei cheratinociti (Sugawara et al., 2001), il TNF- α viene prodotto in seguito a vari stimoli (Kock et al., 1990), elevati livelli di questa citochina si trovano in cheratinociti di pazienti con linfomatosi cutanea epidermiotopica (Daliani et al., 1998); nella dermatite allergica da contatto, invece, i cheratinociti producono IL-12 che induce la produzione di IFN- γ (Howie et al., 1996).

In aggiunta alle citochine prodotte e secrete dai cheratinociti molte altre citochine, sintetizzate da altri tipi cellulari, influenzano la produzione di citochine da parte dei cheratinociti sia in maniera diretta che indiretta, tra queste IL-4, IL-13 e IL-17 (Junghans et al., 1996, Akaiwa et al., 2001).

I cheratinociti presentano sia l'mRNA che la proteina del recettore per IL-4 e il trattamento con questa citochina induce proliferazione degli stessi e produzione di IL-6 (Junghans et al., 1996; Albanesi, 2000). IL-4 e IFN- γ modificano la permeabilità dei cheratinociti (Kobayashi et al., 2004).

IL SISTEMA MONOCITO-MACROFAGICO

Il sistema monocito-macrofagico (sistema dei fagociti mononucleati) è una singola unità funzionale costituita dai precursori del midollo osseo, dai monociti circolanti e dai macrofagi tissutali sia liberi che fissi (istociti). In questo sistema sono anche comprese le cellule di Küpffer del fegato, le cellule mesangiali intraglomerulari del rene, i macrofagi alveolari degli alveoli polmonari, i fagociti mononucleati presenti a livello osseo detti “osteoclasti”, la microglia del sistema nervoso centrale e le cellule di Langerhans della cute. Il sistema dei fagociti mononucleati svolge due funzioni principali: la fagocitosi degli antigeni corpuscolati e la presentazione dell’antigene ai linfociti T.

I monociti (10-18 μm di diametro) sono cellule la cui produzione e differenziamento avvengono nel midollo osseo, attraverso un processo che determina la trasformazione dei progenitori mieloidi, presenti nel midollo, in promonociti e quindi in monociti circolanti. I monociti, che rappresentano il 2-10% dei globuli bianchi del sangue periferico, migrando ai tessuti, attraverso le pareti vasali, divengono macrofagi tissutali.

I macrofagi possono assumere forme diverse; alcuni possiedono un abbondante citoplasma e sono chiamati cellule epiteloidi per la loro somiglianza con le cellule epiteliali cutanee; possono inoltre fondere tra loro per dare luogo alle cellule giganti multinucleate (MGC).

Sono estremamente mobili e dotati di elevata attività fagocitica. Sono caratterizzati da un grosso nucleo di forma variabile, che spesso presenta una profonda indentatura che si accentua con la progressiva maturazione della cellula, al punto tale che il nucleo può arrivare ad assumere un aspetto a “ferro di cavallo” o addirittura bilobato. Il citoplasma contiene piccoli lisosomi che conferiscono al monociti, osservato al microscopio ottico, un aspetto caratteristico a “vetro smerigliato”. I lisosomi contengono numerose idrolasi acide, importanti per la distruzione intracellulare dei microrganismi. L’osservazione al microscopio elettronico permette di rilevare un citoplasma contenente un numero variabile

di ribosomi, un reticolo endoplasmatico rugoso relativamente poco esteso e un apparato del Golgi ben sviluppato, mitocondri di forma allungata. Numerosi sottili pseudopodi protrudono dalla cellula e ne attestano la capacità fagocitaria e di compiere movimenti ameboidi. Sono inoltre presenti granuli citoplasmatici elettrondensi, omogenei e circondati da membrana; i granuli primari contengono perossidasi e fosfatasi acida.

I monociti vengono richiamati dalla presenza di materiale necrotico (necrotassi), o da sostanze rilasciate da microrganismi invasori (chemiotassi) e/o prodotte nel corso dell'infiammazione. Ciò determina la loro migrazione nei tessuti e il differenziamento in macrofagi. Grazie alla loro elevata attività fagocitica e al notevole contenuto di enzimi idrolitici, i macrofagi inglobano e distruggono detriti derivanti dai tessuti e materiale esogeno, che possono essere presenti durante l'infiammazione e la riparazione dei tessuti. I monociti/macrofagi possiedono la capacità di aderire tenacemente alle superfici di vetro e di plastica e, anche *in vitro*, fagocitano attivamente i microrganismi e addirittura le cellule tumorali.

L'adesione al microrganismo e la fagocitosi avvengono in quanto i monociti e i macrofagi esprimono recettori specializzati in grado di legare alcuni carboidrati della parete microbica oppure le IgG o frazioni del complemento di cui il microrganismo è rivestito.

La differenziazione dei monociti in cellule effettrici è chiamata "attivazione macrofagica", questa consiste in una modificazione quantitativa e qualitativa dell'espressione di differenti geni, che conferiscono ai macrofagi la capacità di compiere funzioni che non possono essere esplicate dal monocita.

L'attivazione dei macrofagi è un fenomeno complesso che si svolge in più fasi e che richiede stimoli sequenziali quali le citochine, l'endotossina, vari mediatori e regolatori dell'infiammazione. Le funzioni effettrici si manifestano con modificazioni caratteristiche nella morfologia e nella fisiologia del macrofago. I macrofagi rispondono all'LPS

producendo TNF- α , che a sua volta, induce la sintesi di IL-1. TNF- α e IL-1 stimolano le cellule endoteliali a produrre altre citochine (per es. IL-6 e IL-8) e molecole di adesione. Di conseguenza l'iniziale rilascio di LPS genera una cascata di citochine che aumenta la risposta infiammatoria e potenzia l'eliminazione dei microrganismi.

Le molecole che partecipano attivamente all'adesione e all'attivazione dei monociti/macrofagi sono il recettore per il complemento CR3, espresso in particolare dai macrofagi attivati, il recettore per il complemento CR4 (p150, 95) e "l'antigene associato alla funzione leucocitaria" (LFA-1). I monociti/macrofagi esprimono anche molecole MHC di classe I e II, che sono importanti per una corretta presentazione degli antigeni alle cellule T. I macrofagi attivati esprimono un recettore a bassa affinità per il frammento Fc delle IgE; altre molecole presenti sui macrofagi umani sono CD13, CD15, CD68 e VLA-4 (CD29/CD49d).

I monociti/macrofagi umani e murini esprimono recettori del mannosio, del fucosio e dell'N-acetilglucosamina che si legano a questi zuccheri presenti sulla superficie microbica e su cellule eucarioti come gli eritrociti invecchiati. Esprimono inoltre il recettore CD14 che lega il lipopolisaccaride liberato dai batteri Gram-negativi.

I monociti/macrofagi esprimono tre diversi recettori per il frammento Fc delle IgG:

- Fc γ RI (CD64) recettore ad elevata affinità per le IgG (che equivale al recettore Fc γ RIIa nel topo);
- Fc γ RII (CD32) recettore ad affinità intermedia (che equivale al recettore Fc γ RIIb/1 nel topo);
- Fc γ RIII (CD16) recettore a bassa affinità (che equivale al recettore Fc γ RIo nel topo).

Oltre ai marcatori sopra citati, macrofagi e monociti esprimono anche recettori per citochine come IL-2, IL-4 e IFN γ . A loro volta i macrofagi attivati producono citochine

come IFN- α , IL-12, IL-6, IL-18, IL-1 e TNF- α ; vengono oltre a ciò prodotte prostaglandine, componenti del complemento, intermedi reattivi dell'ossigeno e ossido di azoto (ad opera dell'enzima nitrossido sintetasi, NOS) (Janeway et al., 2003).

I recettori P2 espressi nei macrofagi

I primi studi condotti da Steinberg e Silverstein dimostrarono come la linea macrofagica di topo, J774, esprimesse un recettore selettivamente attivato dall'ATP e da pochi suoi analoghi (Steinberg e Silverstein, 1987). La stimolazione di questo recettore comportava l'incremento reversibile della permeabilità della membrana plasmatica a soluti con basso peso molecolare: meccanismo questo originariamente descritto in mast cellule di ratto (Cockcroft e Gomperts, 1980). Questi studi misero in evidenza il fatto che il recettore attivato dall'ATP induceva morte cellulare.

Greenberg e collaboratori dimostrarono che i macrofagi J774 esprimono anche recettori P2Y accoppiati alla mobilizzazione di Ca^{2+} attraverso un meccanismo diverso da quello che coinvolgeva il recettore permeabilizzante, attivato dall'ATP (Greenberg et al., 1997).

Gordon propose per il recettore permeabilizzante dei macrofagi il nome di P2Z, e ipotizzò fosse analogo al recettore dell'ATP di mast cellule e linfociti.

Tutte le linee macrofagiche murine esprimono recettori P2Y accoppiati al rilascio del Ca^{2+} dai depositi intracellulari e alla generazione di IP_3 . Le linee macrofagiche umane THP-1 e U937 esprimono recettori P2Y (P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆), ma solo la linea THP-1 esprime il recettore P2X₇.

Monociti isolati da sangue periferico esprimono i recettori P2Y ma non il P2X₇.

Silverstein e collaboratori, descrissero i nucleotidi esogeni come stimoli per i macrofagi ed osservarono che l'ATP extracellulare inibisce la fagocitosi mediata da Fc, induce ingresso

di Na^+ , fuoriuscita di K^+ e aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Sempre in questi studi è stato osservato che i macrofagi esprimono specifici recettori per l'ATP. (Steinberg e Silverstein, 1987).

È stata inoltre avanzata l'ipotesi che i macrofagi e, in generale le cellule infiammatorie, possano usare i recettori P2 come veri e propri sensori per percepire la presenza di cellule e tessuti danneggiati.

Le cellule della linea J774 reagiscono chemiotatticamente in risposta a concentrazioni micromolari di ADP ma non UTP (Greenberg et al., 1997). Macrofagi umani in vicinanza di cellule K562 morenti, hanno mostrato di subire, *in vitro*, un rapido aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ che può essere mimato dall'aggiunta di cellule lisate o di dosi micromolari di ATP. Tali esperimenti hanno portato ad ipotizzare che l'ATP e altri nucleotidi intracellulari funzionino come un primo segnale di allarme che allerta i macrofagi di eventuali danni occorsi a cellule e a tessuti.

L'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ potrebbe essere usato dai macrofagi per il potenziamento dei meccanismi di difesa antimicrobici.

Nei macrofagi murini e umani, l'ATP extracellulare induce il rilascio di TNF e IL-1 β .

Per il rilascio di IL-1 β matura sono necessari due stimoli:

- l'LPS, che determina la trascrizione del gene e l'eventuale rilascio della forma immatura della citochina;
- uno stimolo che attivi la caspasi-1 e in grado di convertire la pro-citochina nella forma matura.

L'ATP è un potente stimolo per l'attivazione di ICE: ciò è stato dimostrato attraverso l'impiego di un inibitore di ICE, il tetrapeptide Y-VAD (Try, Val, Ala, Asp), che blocca la maturazione dell' IL-1 β ATP-dipendente.

Nei macrofagi umani, l'ATP è un potente stimolo non solo per l'attivazione della caspasi-1 ma anche per l'esternalizzazione delle subunità della caspasi-1 matura.

Studi condotti su macrofagi umani e murini e su cellule della microglia di topo suggeriscono che la segnalazione dell'LPS per il rilascio dell'IL-1 β consiste in una stimolazione autocrina/paracrina mediata attraverso la secrezione di ATP.

Proctor e collaboratori dimostrarono che l'analogo dell'ATP, il 2-metiltilio-ATP (2-MeS-ATP), agonista sia dei recettori P2Y che dei P2X, inibiva il rilascio, indotto da endotossina batterica, di TNF- α e IL-1 β proteggendo i topi dalla morte per shock endotossico (Proctor et al., 1994).

La stimolazione con nucleotidi extracellulari induce l'attivazione dell'enzima iNOS, un'enzima chiave per l'attività battericida dei macrofagi; i nucleotidi di per sè sono inefficaci, ma la coesposizione con basse dosi di ATP (o UTP) ed LPS ha la capacità di determinare una stimolazione molto elevata dell'enzima iNOS, rispetto a quella indotta dal solo LPS.

In macrofagi murini Raw 264.7 è necessaria un'incubazione prolungata (18 ore) per provocare rilascio di NO, suggerendo che la stimolazione dei recettori P2 comporta un aumento dell'espressione del gene iNOS piuttosto che aumento dell'attività dell'enzima.

Denlinger e collaboratori verificarono che il pre-trattamento con 2-MeS-ATP previene l'espressione di iNOS e la generazione di NO dovuta al trattamento con LPS: ciò fa pensare ad una possibile partecipazione dei recettori P2 nella trasduzione del segnale indotto dall'LPS. Inoltre, è stato recentemente dimostrato che la produzione di NO, dovuta all'infezione da *Mycobacterium tuberculosis*, avviene anche in topi "knockout" per P2X₇ e viene inibita bloccando i recettori P2: ciò indica la partecipazione al processo di altri sottotipi P2 (Denlinger et al., 1996).

Quanto riportato suggerisce che i recettori P2 potrebbero avere un ruolo nella stimolazione macrofagica mediata da endotossine o parassiti.

Il trattamento di macrofagi o di cellule della microglia con oATP o apirasi inibisce il rilascio LPS-dipendente dell'IL-1 β ; oATP e PPADS inibiscono anche il rilascio LPS-dipendente di NO e l'attivazione di NF- κ B e MAPK.

Alla luce di quanto riportato, ovvero che l'ATP è coinvolto nell'attivazione dell'NF- κ B attraverso P2X₇ e che tale attivazione è bloccata da oATP, è probabile che il recettore P2 che partecipa all'attivazione LPS-dipendente dei macrofagi sia P2X₇.

Spesso durante reazioni infiammatorie croniche, i macrofagi differenziano in cellule epitelioidi che possono fondere tra loro per dare luogo alle cellule giganti multinucleate (MGCs). Falzoni e colleghi, suggeriscono che il recettore P2X₇ possa essere coinvolto nella formazione di tali cellule (Falzoni et al., 1995).

Macrofagi umani monocito-derivati possono essere indotti alla fusione *in vitro* attraverso l'incubazione con concanavalina A o fitoemagglutina e il pretrattamento con oATP inibisce questo processo.

Questi studi sono stati in seguito estesi a macrofagi J774. Sono stati selezionati parecchi cloni, alcuni esprimenti P2X₇ ad elevati livelli (P2X₇iper), altri esprimenti il recettore a bassi livelli (P2X₇ipo). Le cellule P2X₇iper fondono spontaneamente in coltura a formare MGCs di differenti dimensioni e forma, e contenenti da pochi a 20 o più nuclei. Un anticorpo monoclonale contro il dominio esterno del P2X₇ previene la fusione di macrofagi umani in coltura.

La partecipazione di ICE, nel rilascio di IL-1 β e nella formazione delle MGCs stabilisce un interessante legame tra P2X₇ e l'infiammazione cronica.

Molloy e collaboratori osservarono che l'ATP extracellulare in colture macrofagiche infettate da *Mycobacterium bovis* (bacillo di Calmette-Guèrin) induceva l'attivazione del recettore P2X₇, che causava l'uccisione del fagocita e del patogeno intracellulare (Molloy et al, 1994). Il meccanismo coinvolto non è chiaro, ma un recente studio, suggerisce che

potrebbe richiedere l'attivazione della fosfolipasi D. Un'altra possibilità è che l'ATP riduca la vitalità del patogeno intracellulare attraverso la fusione tra fagosoma e lisosoma. L'abilità dei macrofagi nell'eliminare i parassiti intracellulari viene aumentata in seguito all'attivazione dell'IFN- γ ; potrebbe di conseguenza non essere una coincidenza che queste citochine e altri fattori proinfiammatori aumentino l'espressione di P2X₇.

LE CITOCCHINE

Le citochine sono una classe eterogenea di proteine secretorie di piccole dimensioni (peso molecolare 8-80 kDa) prodotte dalle cellule di entrambi i compartimenti del sistema immunitario: quello innato (macrofagi, leucociti polimorfonucleati e cellule NK) e quello specifico (linfociti T e B).

Sono mediatori che agiscono come segnali inter-cellulari; vengono secrete in risposta agli antigeni e sono in grado di stimolare risposte diverse da parte delle cellule coinvolte nei processi immunitari e infiammatori.

Nella fase d'attivazione delle risposte immunitarie esse favoriscono la crescita e la differenziazione dei linfociti, mentre nella fase effettrice attivano cellule diverse, promuovendo così l'eliminazione dei microbi e degli altri antigeni. Alcune citochine fungono, inoltre, da stimolatori dello sviluppo di cellule emopoietiche; sono quindi molecole molto potenti che possono causare cambiamenti nella proliferazione, differenziazione e migrazione cellulare.

Per tutti questi motivi vengono impiegate nella pratica medica come importante strumento terapeutico e possono costituire un possibile bersaglio da antagonizzare al fine di curare molte malattie a base immunitaria e infiammatoria.

Anche nell'ambito della clinica e della sperimentazione animale sono sempre più utilizzate, al fine di potenziare o bloccare reazioni immunitarie e infiammatorie o per coadiuvare l'emopoiesi; si suole, infatti, riferirsi a queste molecole col termine di *“modificatori della risposta biologica”*.

Alla famiglia delle citochine appartengono: le interleuchine (IL), gli interferoni (IFN), i fattori stimolanti le colonie (CSF), i fattori di necrosi tumorale (TNF), i fattori di crescita e le chemiochine.

Caratteristiche generali

Le citochine sono polipeptidi in grado di mediare e di regolare le risposte immunitarie e infiammatorie. Sebbene si tratti di una famiglia di molecole molto eterogenee, si possono in ogni modo identificare alcune caratteristiche comuni (**Figura 8**).

- La loro secrezione è un fenomeno di breve durata ed auto-limitato: le citochine non sono accumulate in granuli, ma prodotte *de novo* in seguito allo stimolo.
- Ciascuna agisce su tipi cellulari diversi (pleiotropismo).
- L'azione delle citochine può essere locale o sistemica. Possono agire, infatti, a livello intracellulare sulla cellula stessa che le ha prodotte (azione autocrina) oppure su cellule vicine (azione paracrina) o ancora su cellule lontane (azione endocrina), utilizzando il sistema ematico come mezzo di trasporto.

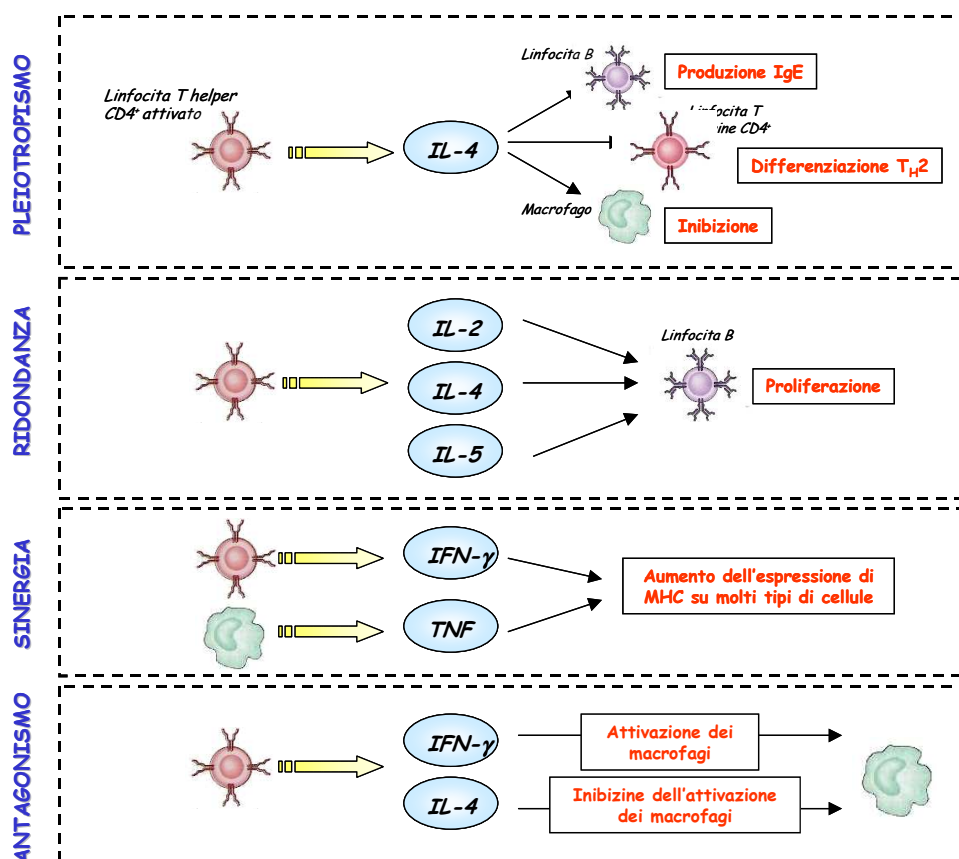


Figura 8) Schematizzazione dei fenomeni di pleiotropismo, ridondanza, sinergia e antagonismo.

- L'attività delle citochine è ridondante (diverse citochine esercitano lo stesso effetto).
- Due citochine possono interagire tra loro antagonizzandosi (una citochina può inibire gli effetti di un'altra), oppure può avere un effetto sinergico, producendo così un risultato superiore alla somma degli effetti di ciascuna di esse.

Alla pari di altri ormoni peptidici, esercitano la loro attività legandosi a specifici recettori espressi sulla superficie delle cellule bersaglio.

Funzioni delle citochine

Le citochine in base alla *funzione* che svolgono possono essere suddivise in tre gruppi:

1) Citochine che mediano e regolano l'immunità innata

Sono prodotte in particolare da fagociti mononucleati.

Nelle infezioni da parte di batteri extracellulari, i macrofagi rispondono alle endotossine e ad altri prodotti batterici producendo TNF, IL-1 e chemiochine. Il TNF e l'IL-1 agiscono sull'endotelio vascolare in prossimità del sito infiammatorio inducendo l'espressione di molecole di adesione che favoriscono l'adesione alle pareti vasali, di neutrofilii e monociti circolanti. Le chemiochine prodotte dai macrofagi e dalle cellule endoteliali favoriscono la fuoriuscita di tali cellule dal letto capillare.

I macrofagi reagiscono inoltre, a microrganismi intracellulari ed extracellulari secernendo IL-12 che induce la produzione di IFN- γ da parte delle cellule "Natural Killer" e dei linfociti T. L'IFN- γ attiva poi i macrofagi favorendo in tal modo la distruzione dei microbi fagocitati. IL-12 complementa l'azione di IL-18 e stimola reazioni cellulo-mediate polarizzando lo sviluppo dei linfociti T_H0 in senso T_H1 .

2) Citochine che regolano e mediano l'immunità specifica

Sono principalmente prodotte dai linfociti T in risposta al riconoscimento di antigeni estranei. Alcune citochine reclutano, attivano e controllano cellule effettrici specializzate, come ad esempio fagociti mononucleati, contribuendo così all'eliminazione dell'antigene nella fase effettrice della risposta.

3) Citochine che stimolano l'emopoiesi

Sono prodotte da cellule stromali del midollo osseo, leucociti ed altri tipi di cellule. Le citochine che promuovono la crescita e la differenziazione dei progenitori presenti nel midollo osseo sono chiamate "fattori stimolanti la formazione di colonie" (CSF).

Recettori delle citochine

Le citochine, come gli ormoni di origine proteica, svolgono la loro attività legandosi, spesso con elevata affinità, a recettori specifici (**Figura 9**); bastano, infatti, basse concentrazioni di citochine per avere un effetto.

Tutti i recettori per le citochine sono costituiti da tre porzioni: una extracellulare responsabile del legame della citochina, una transmembrana e una citoplasmatica coinvolta nell'innescamento della cascata dei segnali intracellulari.

I recettori per le citochine constano di almeno due catene i cui domini citoplasmatici sono in grado di legare JAK-chinasi (Janus Chinasi), proteine citosoliche con un dominio carbossiterminale ad attività chinasi. Il legame con la citochina fa dimerizzare i recettori e permette così alle JAK-chinasi di transattivarsi a vicenda, fosforilando anche il recettore.

Nel citoplasma sono anche presenti le proteine STAT (trasduttori del segnale e fattori di trascrizione) che, a coppie, si legano al sito fosforilato del recettore e vengono fosforilate dalle JAK-chinasi. Una volta fosforilate, le STAT si staccano, dimerizzano, vanno nel nucleo e attivano la trascrizione di geni importanti per l'immunità adattativa.

La loro classificazione si basa sull'omologia strutturale tra i domini extracellulari di questi recettori. Secondo tale classificazione possono essere raggruppati in cinque famiglie.

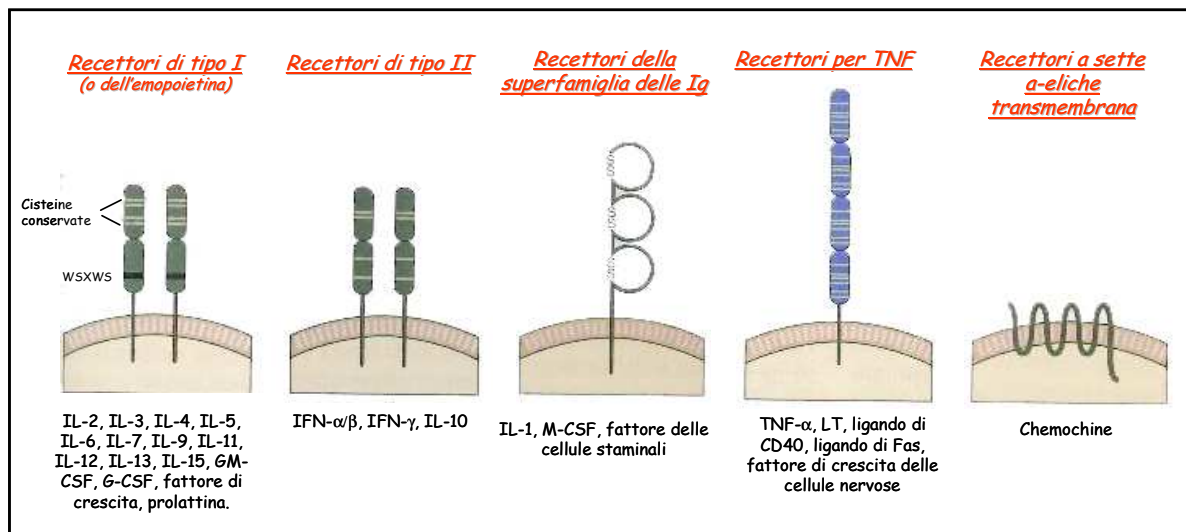


Figura 9) Schematizzazione della struttura dei recettori per le citochine. I recettori per le diverse citochine sono suddivisi in cinque famiglie sulla base della presenza di strutture o domini conservati nella porzione extracellulare. Sotto ciascun disegno sono elencate le citochine o i ligandi dei recettori stessi.

Recettori di tipo I

Tali recettori, chiamati anche recettori dell'emopoietina, contengono una o più copie di un dominio dotato di residui di cisteina e di una sequenza, composta da triptofano-serina-X-triptofano-serina- (WSXWS, in cui la X rappresenta un aminoacido non conservato). Questo tipo di recettori lega molecole che si ripiegano formando α -eliche. Sono recettori multimerici, essendo costituiti da una catena deputata all'interazione con la citochina ed una o più catene destinate alla trasduzione del segnale. La specificità di legame per le differenti citochine è conferita da residui aminoacidici diversi da un recettore all'altro. Appartengono a questa famiglia quelli per: IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, GM-CSF, G-CSF e prolattina.

Recettori di tipo II

Questi recettori sono simili a quelli di tipo I, per la presenza di residui di cisterna, ma a differenza di questi non contengono sequenze WSXWS; sono anch'essi costituiti da una catena deputata al legame con la citochina e da una catena destinata alla trasduzione del segnale. Recettori di tipo II sono ad esempio quelli per IFN- α , IFN- β , IFN- γ e IL-10.

Superfamiglia delle Ig

La superfamiglia delle Ig, alla quale appartengono recettori per citochine che contengono domini extracellulari di tipo Ig, comprende i recettori per IL-1, GM-CSF e il fattore delle cellule staminali.

Recettori del TNF

I recettori del TNF sono dotati di domini extracellulari conservati, ricchi di cisteine. A seguito dell'interazione con il ligando attivano proteine intracellulari in grado di stimolare l'espressione genica o di indurre apoptosi; in alcuni casi possono verificarsi entrambi i fenomeni. A questo gruppo appartiene Fas/CD95/APO-1 riconosciuto dal ligando di Fas (FasL). Quando FasL si lega al recettore induce la trimerizzazione dello stesso portando a contatto tra loro i domini di morte presenti sul lato citoplasmatico del recettore stesso. Diverse proteine adattatrici (FADD) con domini di morte, si legano a quelli del recettore con interazioni omofiliche, inducendo l'attivazione delle procaspasi-8, -2 e -10. La procaspasi-8 si attiva, taglia la procaspasi-3 a caspasi-3 attiva, che a sua volta si lega all'inibitore del fattore di trascrizione citoplasmatico CAD (DNA-asi, attivata dalle caspasi), lo taglia e permette la sua transmigrazione nel nucleo dove degrada il DNA inducendo apoptosi.

Recettori a sette domini α -elica transmembrana

Sono anche definiti “recettori a serpentina” poiché i loro domini transmembrana attraversano il doppio strato lipidico della membrana cellulare più volte e trasducono il segnale attraverso proteine G trimeriche. Nello stato attivo le proteine trimeriche G hanno una forte affinità per il GDP. Appartengono a questo gruppo i recettori delle chemiochine, quando la chemioquina si lega al recettore, la proteina G si lega alla parte intracitoplasmatica del recettore e perde affinità per il GDP; questo porta ad un cambio conformazionale del trimero e una conseguente dissociazione nelle subunità α -GTP e $\beta\gamma$. Il processo ha termine quando la subunità α , che ha un'attività GTP-asi intrinseca, taglia il GTP in GDP e permette la riassociazione del GDP con le subunità α , β e γ .

Interleuchina 4 (IL-4)

Appartiene alla famiglia di citochine a 4 domini α -elica. La sua principale sorgente cellulare sono i linfociti T $CD4^+$ appartenenti alla sotto-popolazione T_H2 , mastociti e basofili (Nelms et al., 1999).

L'IL-4 rappresenta il principale stimolo per la produzione di anticorpi IgE e per lo sviluppo delle cellule T_H2 da parte dei linfociti T helper $CD4^+$ vergini. Gli anticorpi della classe IgE svolgono un ruolo importante nella difesa mediata da eosinofili contro le infezioni da elminti o artropodi ma rappresentano anche il principale mediatore delle reazioni di ipersensibilità immediata o allergica.

Questa citochina è anche in grado di antagonizzare l'azione attivante esplicata dall'IFN- γ sui macrofagi, inibendo così le reazioni immunitarie cellulo-mediate: è probabilmente questo uno dei meccanismi attraverso cui le cellule T_H2 esercitano un'azione inibitoria sui fenomeni infiammatori.

L'interleuchina-4 è una citochina multifunzionale in grado di giocare un ruolo molto importante nella regolazione delle risposte immuni; tali effetti dipendono però dal legame con lo specifico recettore. Questo è presente a livello delle cellule ematopoietiche, endoteliali, epiteliali, muscolari, dei fibroblasti, degli epatociti e dei tessuti nervosi (Nelms et al., 1999, Ohara et al., 1987; Lowenthal et al., 1998). E' formato da una catena α di 140 kDa in grado di legare la citochina con elevata affinità e da una catena (γ_c), per prima identificata a livello del recettore per l'IL-2. Nelle cellule non linfoidi la catena α del recettore per IL-4 non è associata con la catena γ_c , ma con una catena deputata alla traduzione del segnale che fa parte anche del recettore per l'IL-13. Il segnale trasmesso da questo recettore innesca sia una via JAK/STAT che una via chiamata IRS-2 (*Insulin Response Substrate*), che coinvolge il substrato di risposta all'insulina.

IL-4 è l'unica citochina che attiva la proteina STAT6, responsabile di molte delle reazioni svolte dalla citochina, tra cui la differenziazione delle cellule T_{H2} e lo scambio isotopico verso le IgE nei linfociti B. L'attivazione della via IRS-2 invece, è responsabile della proliferazione cellulare indotta da IL-4.

Tale citochina gioca un ruolo importante nell'adesione dei tessuti e nell'infiammazione; agisce insieme al TNF inducendo l'espressione di molecole di adesione cellulare a livello vascolare, come VCAM-1, o cellule endoteliali vascolari (Thornhill et al., 1991) e downregola l'espressione di E-selectina (Bennet et al., 1997).

IL-4 risulta essere una citochina importante nel trattamento delle malattie infiammatorie e autoimmuni grazie alla sua capacità di inibire la produzione di citochine infiammatorie come IL-1, IL-6 e TNF- α dai monociti e TNF dalle cellule T. IL-4 gioca inoltre un ruolo essenziale nella patogenesi di malattie linfatiche croniche come le leucemie (Dancescu et al., 1992).

Studi recenti hanno messo in evidenza come questa citochina rappresenti il "miglior mediatore" nella terapia di malattie autoimmuni della cute come la psoriasi (Numerof et al., 2006; Martin, 2004), piuttosto che IL-10 o IL-11 o alcune delle svariate citochine che sono implicate in alcuni aspetti delle risposte Th2 (Ghoreschi et al., 2003).

Interleuchina 18 (IL-18)

L'interleuchina 18 è anche nota come fattore di induzione dell'IFN- γ ("interferon-gamma-inducing factor, IGIF) per la sua capacità di indurre in topi infettati da *Propionibacterium acnes* o stimolati con lipopolisaccaride batterico, la produzione di IFN- γ .

Il gene murino dell'IL-18 si trova sul cromosoma 9 e codifica 192 aminoacidi, mentre quello umano è localizzato sul cromosoma 11q22 e codifica 193 aminoacidi.

L'IL-18 viene sintetizzata come precursore biologicamente inattivo (pro-IL-18) avente peso molecolare di 24 kDa; il taglio proteolitico viene effettuato a livello del residuo aminoacidico Asp-36 da una serin-proteasi intracellulare, detta ICE ("IL-1 β converting enzyme" o caspasi 1) e determina la trasformazione/conversione della citochina nella forma matura di peso molecolare di 18 kDa (Gu et al., 1997).

E' stata di recente identificata una serin-esterasi di 29 kDa, la proteinasi-3 (PR-3), un enzima extracellulare rilasciato a seguito dell'attivazione di neutrofilo, monociti, cellule endoteliali, mast cellule, che taglia la pro-IL-18 producendo la forma attiva della proteina (Fantuzzi et al., 1998; Dinarello, 1998). Ciò suggerisce che l'IL-18 possa essere attivata sia a livello intracellulare che extracellulare.

La caspasi-3 taglia sia il precursore che la forma matura dell'IL-18 producendo forme degradate, biologicamente inattive, della proteina. La caspasi è quindi un potenziale "down-regolatore" dell'IL-18 (**Figura 10**).

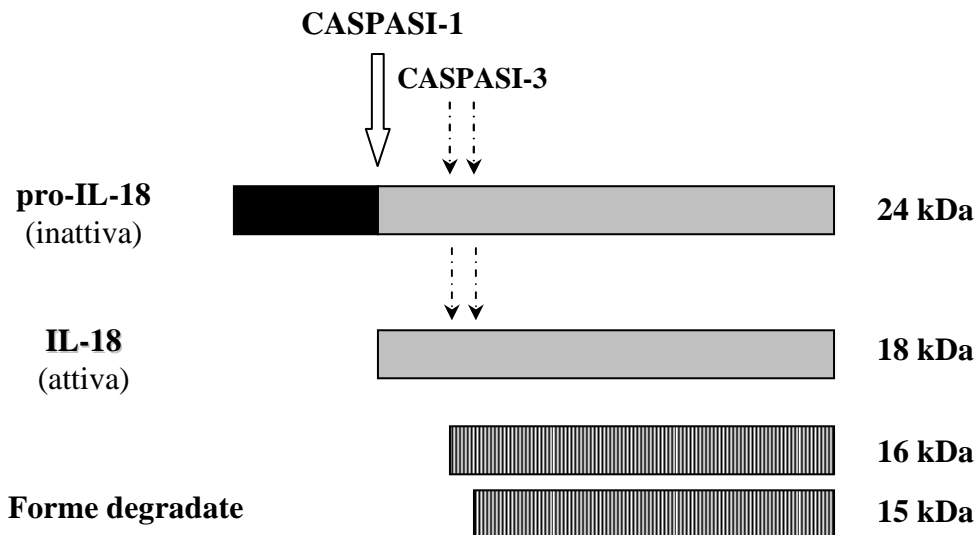


Figura 10) Elaborazione dell'IL-18 in seguito all'azione della caspasi-1 e della caspasi-3. La caspasi-1 taglia la proIL-18 nella forma matura di 18 kDa; mentre la caspasi-3 taglia la forma immatura di 24 kDa in due frammenti biologicamente inattivi, rispettivamente di 16 e 15 kDa.

Il recettore per l'IL-18 (IL-18R) è un eterodimero composto da una catena α e una β . La catena α , inizialmente descritta come "IL-1 receptor-related protein" (IL-1Rrp), lega il ligando (IL-18), mentre quella β è una catena accessoria ed è denominata "accessory protein-like" (AcPL). Queste due catene appartengono alla famiglia dei recettori dell'IL-1 e hanno la stessa organizzazione strutturale. La catena α del recettore per IL-18 lega la citochina con bassa affinità, mentre la β non lega IL-18 ma aumenta l'affinità del recettore per la citochina ed è implicata nella trasduzione del segnale (Born et al., 1998).

IL-18R è selettivamente espresso sulle cellule Th1 ma non Th2: tale caratteristica può essere sfruttata come marcatore di superficie per distinguere i due tipi cellulari.

Elevate quantità di IL-18 vengono secrete da macrofagi, cellule del Küpffer (Stoll et al., 1998) e cellule di Langerhans (Brossart et al., 1998).

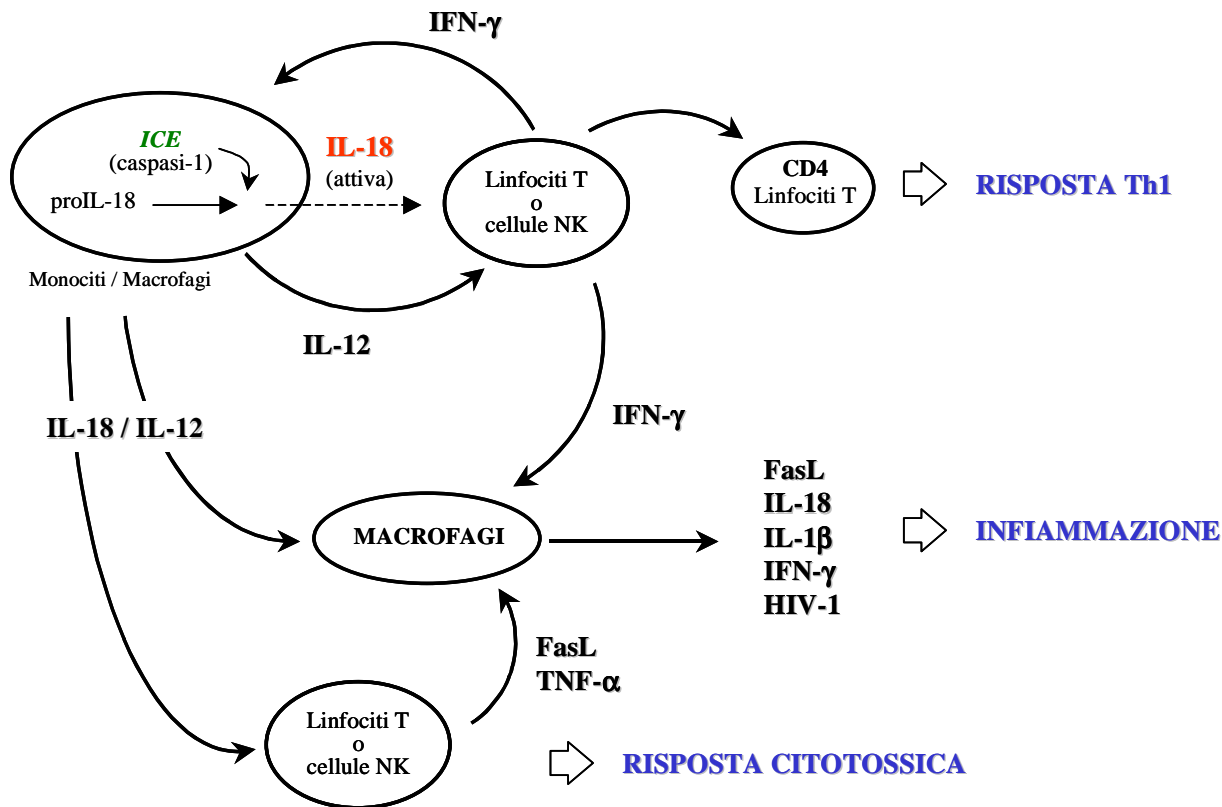


Figura 11) Via di rilascio dell'IL-18.

IL-18 viene prodotta dai macrofagi in risposta all'LPS e ad altri prodotti batterici che stimolano la produzione di IFN- γ da parte di cellule NK e linfociti T. In tal senso, la citochina svolge un'azione sinergica all'IL-12, comportandosi perciò da induttore dell'immunità cellulo-mediata. IL-12 è necessaria affinché IL-18 induca la produzione di IFN- γ ; IL-18 induce la produzione di IFN- γ solo quando il recettore è "up-regolato" tramite IL-12. IL-18 agisce in sinergia con IL-12 per la differenziazione delle cellule Th1, mentre non ha alcun effetto sul differenziamento delle cellule Th2 e relativa produzione di citochine (**Figura 11**).

Studi condotti *in vivo* su topi mancanti dei geni per IFN- γ e per IL-12 hanno messo in evidenza come gli effetti antitumorali dell'IL-18 siano marginalmente correlati alla produzione delle due citochine e agli effetti antineoplastici dell'IL-18 coinvolgano per la maggior parte risposte citotossiche FasL-mediate e inibizione dell'angiogenesi tumorale (Hashimoto et al., 1999).

IL-18 è costitutivamente prodotta nella forma immatura da cellule APC, ma può anche essere attivata durante una risposta infiammatoria. L'attività proinfiammatoria della citochina è dovuta alla sua capacità di stimolare la produzione di citochine infiammatorie, chemiochine, ossido nitrico e prostaglandine ed è amplificata dalla capacità di indurre la produzione di IFN- γ , che a sua volta attiva i macrofagi. IL-18 induce la sintesi di TNF- α da parte di cellule CD4⁺ e cellule NK nonché la sintesi di IL-1 β in monociti-macrofagi. E' inoltre in grado di indurre la produzione di IL-6 da parte di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) attivate con LPS, e mostra proprietà chemioattrattive nei confronti delle cellule polimorfonucleate, stimolando anche la produzione di IL-18 stessa. IL-18, così come IL-1, è una proteina priva di peptide segnale per la secrezione attraverso reticolo endoplasmatico e Golgi; per anni si è cercato di capire quale potesse essere il meccanismo di rilascio di questa proteina. Negli ultimi anni numerosi studi hanno suggerito per le cellule immunitarie, l'esistenza di un sistema di secrezione di tipo vescicolare, attraverso due meccanismi di rilascio (**Figura 12**). Il gruppo di Rubartelli ipotizza che, in seguito alla stimolazione con ATP, IL-1 β si accumuli all'interno di vescicole endocitotiche (lisosomi secretori) assieme alla caspasi-1. L'efflusso di ioni K⁺ P2X₇-dipendente indurrebbe l'attivazione di fosfolipasi C fosfatidilcolina-specifica (PC-PLC) e di fosfolipasi A₂ Ca²⁺-indipendente (iPLA₂). L'attivazione di iPLA₂ indurrebbe quella della caspasi-1 e quindi il taglio della citochina all'interno dei lisosomi. PC-PLC causerebbe invece un aumento della concentrazione del Ca²⁺ citosolico e l'attivazione di fosfolipasi A₂ Ca²⁺-dipendenti (cPLA₂), responsabili dell'esocitosi dei lisosomi (Andrei et al., 2004) (**Figura 12 A e B**).

Il modello proposto da Surprenant prevede invece che, in seguito all'attivazione di P2X₇ nei macrofagi, IL-1 β venga "impacchettata" all'interno di microvescicole (0.2-1 μ m di diametro), che vengono rapidamente rilasciate nell'ambiente extracellulare (**Figura 12 C e**

D). La formazione e il rilascio delle microvescicole sono preceduti dall'esposizione di fosfatidilserina sulla membrana esterna, un fosfolipide che solitamente è rivolto verso il versante intercitoplasmatico della membrana plasmatica (MacKenzie et al., 2001). Un simile rilascio di microvescicole è stato dimostrato anche in cellule microgliali di topo (Bianco et al., 2005).

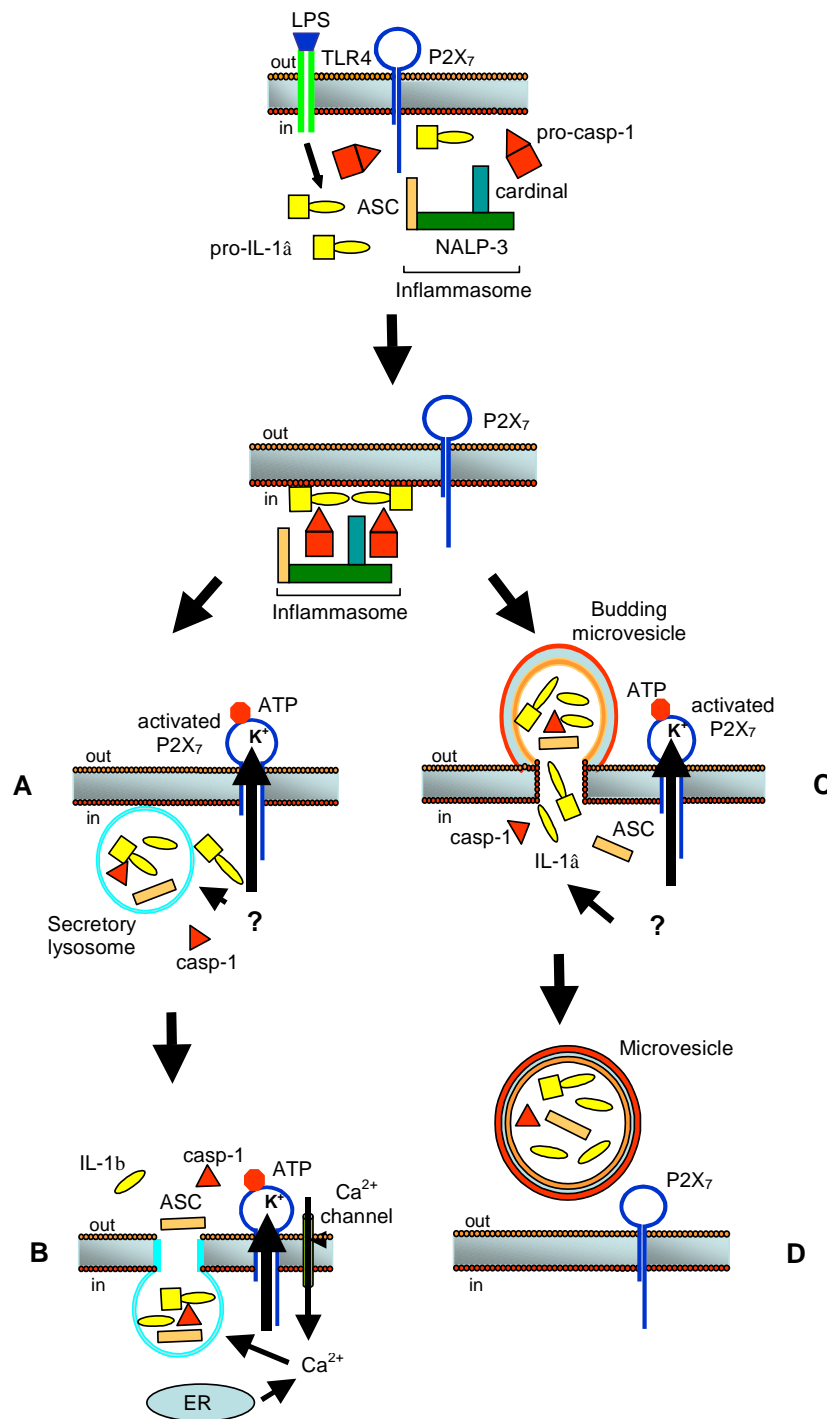


Figura 12) Modelli di rilascio di IL-1 β tramite secrezione di lisosomi o rilascio di microvescicole.

Interferone

Gli interferoni vengono classificati in:

- interferoni di tipo I, cui appartengono l'interferon-alfa e l'interferon-beta;
- interferoni di tipo II, cui appartiene l'interferon-gamma.

I vari interferoni poi si suddividono in differenti proteine analoghe, di cui l'interferon-alfa ha il maggior numero di varianti, alcune glicosilate ed altre non glicosilate.

Nell'uomo, l'IFN- β possiede una sola variante naturale, e così pure l'IFN- γ .

Gli interferoni di tipo I, interferone-alfa e interferone-beta, sono il prodotto di una famiglia multigenica, posizionata sul braccio corto del cromosoma 9. Essi presentano sequenze di acidi nucleici codificanti e di amminoacidi strutturali omologhi al 30-40%, ma non solo i loro geni sono posizionati sullo stesso cromosoma, in più essi condividono anche uno stesso recettore cellulare.

L'interferon-gamma, interferone di tipo II, è posizionato sul braccio lungo del cromosoma 12 e le somiglianze in sequenze di acidi nucleici o di aminoacidi sono insignificanti; inoltre anche il recettore cellulare è differente.

Gli interferoni posseggono molteplici attività: attività antivirale, attività antiproliferativa, citomodificatrice e attività immunomodulatrice.

I meccanismi dell'attività antivirale degli interferoni non sono ancora stati chiariti completamente; infatti l'interferone inibisce la replicazione di un così gran numero di virus, a loro volta così differenti gli uni dagli altri, che si è costretti a ipotizzare differenti meccanismi d'azione.

In aggiunta all'attività antivirale gli interferoni posseggono anche attività antiproliferativa e citomodificatrice; tali attività si esplicano soprattutto mediante la capacità interferonica di allungare il ciclo cellulare, di indurre la differenziazione, di modificare le proprietà della membrana, di aumentare i recettori e gli antigeni di membrana e di modificare il

citoscheletro. Queste proprietà vengono sfruttate nella terapia antitumorale e il potere antiproliferativo dei vari interferoni varia notevolmente in funzione della cellula tumorale con cui si ha a che fare.

Posseggono, inoltre, attività immunomodulatrice in quanto da un lato incrementano l'attività macrofagica, e quindi la loro funzione di cellule presentanti l'antigene, dall'altro stimolano l'attività delle cellule NK (*natural killer*) e dei linfociti *killer*.

Interferone gamma

L'IFN- γ è la principale citochina attivatrice dei macrofagi e svolge una funzione centrale sia nelle risposte innate che nell'immunità cellulo-mediata specifica, promuovendo reazioni infiammatorie a forte componente macrofagica e inibendo al tempo stesso le reazioni in cui siano prevalentemente coinvolti eosinofili. Topi Knockout del gene IFN- γ o del suo recettore presentano grave deficit nell'attivazione macrofagica e sono molto sensibili ad infezioni da parte di microrganismi intracellulari, quali i micobatteri.

L'IFN- γ è una proteina omodimerica prodotta da cellule NK, linfociti CD4⁺T_H1 e cellule CD8⁺.

Il recettore per l'IFN- γ è formato da due polipeptidi strutturalmente omologhi appartenenti alla famiglia dei recettori per citochine di tipo II; una delle due catene lega la citochina, mentre l'altra è deputata alla trasduzione del segnale. Il legame dell'IFN- γ al recettore attiva STAT1, che a sua volta stimola la trascrizione dei geni responsivi a IFN- γ .

Recenti studi hanno messo in evidenza come IFN-gamma possa indurre un arresto della proliferazione e della differenziazione in cellule epiteliali (Saunders et al., 1996).

LE MICROPARTICELLE

Le microparticelle cellulari (MPs) definite anche microvescicole, sono frammenti rilasciati da evaginazioni della membrana plasmatica (“blebs”) di tutti i tipi cellulari quando sottoposti a condizioni di stress ossidativo (Morel et al., 2003) o meccanico, durante l’apoptosi o la necrosi. Le MPs si sono rivelate dei veri e propri vettori di scambio di informazioni biologiche tra cellule (Morel et al., 2003).

Le MPs sono piuttosto eterogenee in termini di dimensioni (0.05-0.1 μm) e per quanto concerne la composizione proteica e lipidica. Differiscono dagli esosomi (0.03-0.1 μm) che originano direttamente dall’esocitosi di corpi multivescicolari endocitici e svolgono un ruolo nella presentazione dell’antigene.

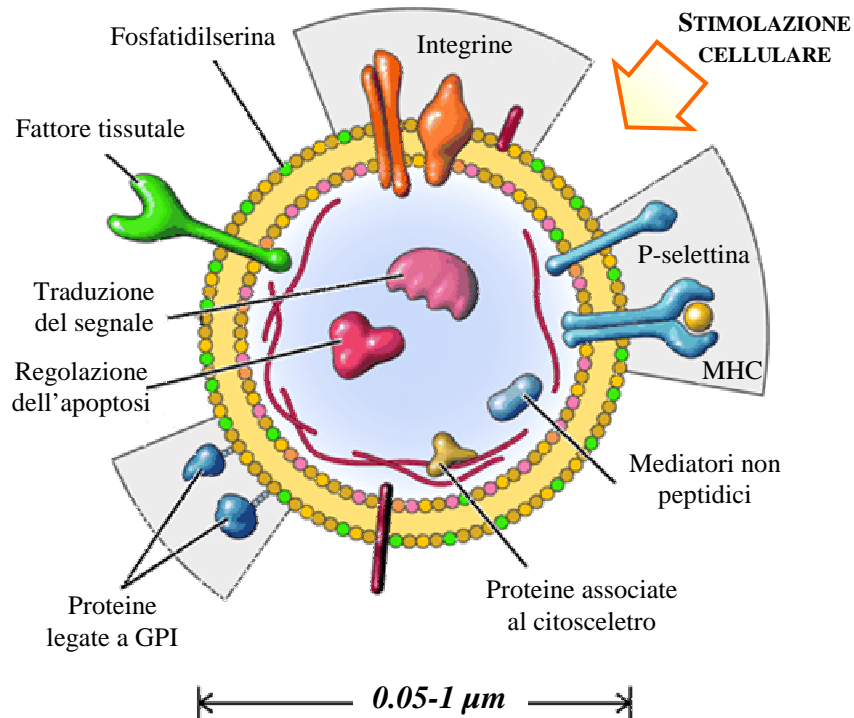


Figura 13) Microparticelle cellulari. Le microparticelle sono rilasciate dalla membrana plasmatica di cellule stimulate.

Le microparticelle sono caratterizzate dall'inversione dei fosfolipidi di membrana e dall'esposizione sulla membrana esterna della fosfatidilserina (PS) che adempie a due importanti funzioni: promuove la coagulazione del sangue e costituisce un segnale di riconoscimento per l'eliminazione di cellule senescenti attraverso il sistema reticolo endoteliale.

In condizioni normali ciascuno dei due foglietti del doppio strato della membrana plasmatica ha una specifica composizione lipidica. Gli aminofosfolipidi (fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina) sono segregati nel foglietto interno mentre la fosfatidilcolina e la sfingomielinina in quello esterno. Nella distribuzione dei lipidi nel doppio strato della membrana partecipano una struttura diretta verso l'interno, detta "flippasi", specifica per la PS e la fosfatidiletanolamina, conosciuta come traslocasi aminofosfolipide; una struttura diretta verso l'esterno, detta "floppasi", e uno scambiatore lipidico promotore di una non specifica redistribuzione bidirezionale attraverso il doppio strato.

Un sostenuto incremento del Ca^{2+} citosolico conseguente la stimolazione cellulare può portare al collasso dell'asimmetria di membrana attraverso la stimolazione dello scambiatore lipidico e dell'attività della "floppasi" e contemporaneamente inibendo la "flippasi".

Il principale cambiamento che si verifica nella distribuzione lipidica è l'esposizione in superficie della PS seguita dal rilascio di MPs in seguito alla degradazione del citoscheletro attraverso proteolisi Ca^{2+} -dipendente.

In situazioni patologiche associate a danno vascolare come nel caso dell'infarto del miocardio, le MPs isolate dal plasma dei pazienti possono provocare danni a livello delle arterie (Bouglanger et al., 2001; Vanwijk et al., 2002). È stato recentemente osservato che MPs derivanti da cellule T apoptotiche inducono disfunzioni endoteliali sia nella conduttanza che nella resistenza delle arterie attraverso alterazione delle vie dell'NO e

della prostaciclina. Inoltre MPs circolanti, in pazienti diabetici, inducono disfunzioni endoteliali e diminuiscono l'espressione dell'NO sintasi (iNOS) (Martin et al., 2004). Tali studi consentono di affermare il ruolo paracrino delle MPs come vettori di effettori bioattivi promuoventi disfunzione vascolare attraverso lo scambio transcellulare durante stati infiammatori (Brodsky et al., 2004; Pfister et al., 2004).

MPs rilasciate da cellule tumorali stimolano le metastasi promuovendo la neovascolarizzazione. La sfingomielina sembra essere la sostanza responsabile del potenziale proangiogenico, stimolando la migrazione delle cellule endoteliali, colonizzazione e formazione di vasi. Alcune metalloproteasi della matrice presenti in MPs derivanti dall'endotelio e dalle piastrine sono potenti stimoli angiogenici *in vitro*.

Il fattore tissutale (TF), il principale iniziatore della coagulazione del sangue, svolge un ruolo importante nella regolazione dell'angiogenesi, della crescita tumorale e della metastatizzazione (Mackman et al., 2004). Il TF media l'up-regolazione del fattore di crescita endoteliale vascolare proangiogenico, e le MPs espongono il TF sulla loro superficie potrebbero in tal modo agire sulle cellule endoteliali per promuovere la formazione di vasi. L'attività di segnale del TF sembra essere legata al suo dominio citoplasmatico che probabilmente è sequestrato all'interno delle MPs (Belting et al., 2004).

Le microparticelle rilasciate dalle piastrine attivate costituiscono la principale popolazione circolante e rappresentano il maggior deposito di fattore tissutale del plasma (Pasquet et al., 1996). Le MPs esprimono molecole di adesione e proteine caratteristiche delle cellule di origine (Satta et al., 1994); quelle derivanti dalle piastrine esprimono integrine di membrana e P-selectina (Heijnen et al., 1999) e contengono l'acido arachidonico (Barry et al., 1999) importante per l'attivazione di piastrine e cellule endoteliali (Barry et al., 1997). Aumentano, inoltre, l'espressione di molecole di adesione cellulare in cellule monocitiche

ed endoteliali ed inducono la produzione di IL-8, IL-1 β e IL-6 in cellule endoteliali e IL-8 e IL-1 β in cellule THP-1 (Nomura et al., 2001).

MPs rilasciate da cellule tumorali esprimono il ligando di Fas capace di indurre apoptosi nelle cellule esprimenti Fas come Natural Killer, linfociti T citotossici, monociti e cellule dendritiche, rappresentando un possibile meccanismo attraverso il quale le cellule tumorali evadono il controllo delle cellule del sistema immunitario (Andreola et al., 2002).

Basse concentrazioni di MPs a livello delle superfici vascolari danneggiate favoriscono l'emostasi fisiologica e l'infiammazione, mentre elevate concentrazioni amplificano il danno tissutale in patologie trombotiche e infiammatorie (Forlow et al., 2000).

Nelle MPs è stata rilevata la presenza dell'IL-1 β (MacKenzie et al., 2001) oltre che di aminofosfolipidi, substrati della fosfolipasi A₂ secretoria, utilizzati per la formazione dell'acido lisofosfatidico, un potente agonista piastrinico e mediatore proinfiammatorio (Fourcade et al., 1995).

Le MPs favoriscono l'attivazione endoteliale e l'interazione monociti-endotelio, le due tappe iniziali del processo di formazione delle placche aterosclerotiche (Huber et al., 2002). Le MPs possono stimolare il rilascio di citochine da parte delle cellule endoteliali ed intervenire nella "up-regolazione" dell'espressione del TF sulla superficie degli endotelioцитi stessi (Mesri et al., 1999).

Le microparticelle sono quindi elementi chiave della coagulazione del sangue ma il loro ruolo fisiologico non è ristretto esclusivamente al loro potenziale procoagulante.

L'INFLAMMASOMA

L'inflammasoma è un complesso multiproteico di circa 700 kDa, responsabile dell'attivazione delle caspasi-1 e 5 ed è in grado di determinare l'elaborazione e la secrezione delle citochine infiammatorie IL-1 β e IL-18.

Ad oggi sono conosciuti due tipi di inflammasoma classificati in base alla presenza di proteine citoplasmatiche denominate NALP, che rappresentano le proteine centrali nel complesso che costituisce l'inflammasoma. La famiglia NALP è composta da 14 membri caratterizzati dalla presenza a livello amino terminale di un dominio di pirina (PYD). Questa struttura è presente in NALP 2-14 mentre NALP1 contiene in aggiunta un altro dominio, definito FIIND e un CARD. Poiché questa classe di proteine è stata scoperta solo recentemente le informazioni riguardo la loro funzione ed espressione è relativamente scarsa.

Per quanto riguarda le funzioni svolte dalle proteine NALP, i primi studi hanno messo in evidenza un possibile ruolo nell'apoptosi in quanto NALP1 è in grado di legare la caspasi-9 e APAF-1 (Hlaing et al., 2001). Studi successivi hanno suggerito poi, un possibile coinvolgimento nel controllo del "pathway" di NF-kB (Manji et al., 2002), sebbene attualmente non è chiaro, il modo in cui vengano attivate le proteine NALP né la loro azione come inibitori (Fiorentino et al., 2002).

NALP1 è conosciuta come DEFCAP/NAC/CARD7 ed è stata la prima proteina della famiglia NALP ad essere identificata sulla base dell'omologia di sequenza con APAF-1 (Hlaing et al., 2001; Chu et al., 2001); inoltre tale proteina è l'unico membro di questa famiglia ad avere un'estensione carbossiterminale contenente un dominio FIIND e un CARD. Inizialmente NALP1 è in grado di indurre apoptosi, da un lato attraverso una associazione diretta con la caspasi-2 e la caspasi-9 (Hlaing et al., 2001), dall'altro attraverso una associazione indiretta con APAF-1.

Dati recenti hanno messo in evidenza il ruolo cruciale di questa proteina nell'attivazione delle caspasi proinfiammatorie. L'mRNA di NALP1 si rinviene a livello del cuore, del timo, fegato, rene, milza, polmone e nei linfociti del sangue periferico (Chu et al., 2001).

NALP3 è anche conosciuta come PYPAF1/Cryopyrin/CIAS1, ed è in grado di attivare la caspasi-1 e NF- κ B (Manji et al., 2002). La sua espressione è limitata alle cellule immunitarie e la sua importanza nell'infiammazione deriva dal fatto che mutazione nel gene di NALP3 sono associate a malattie autoimmuni.

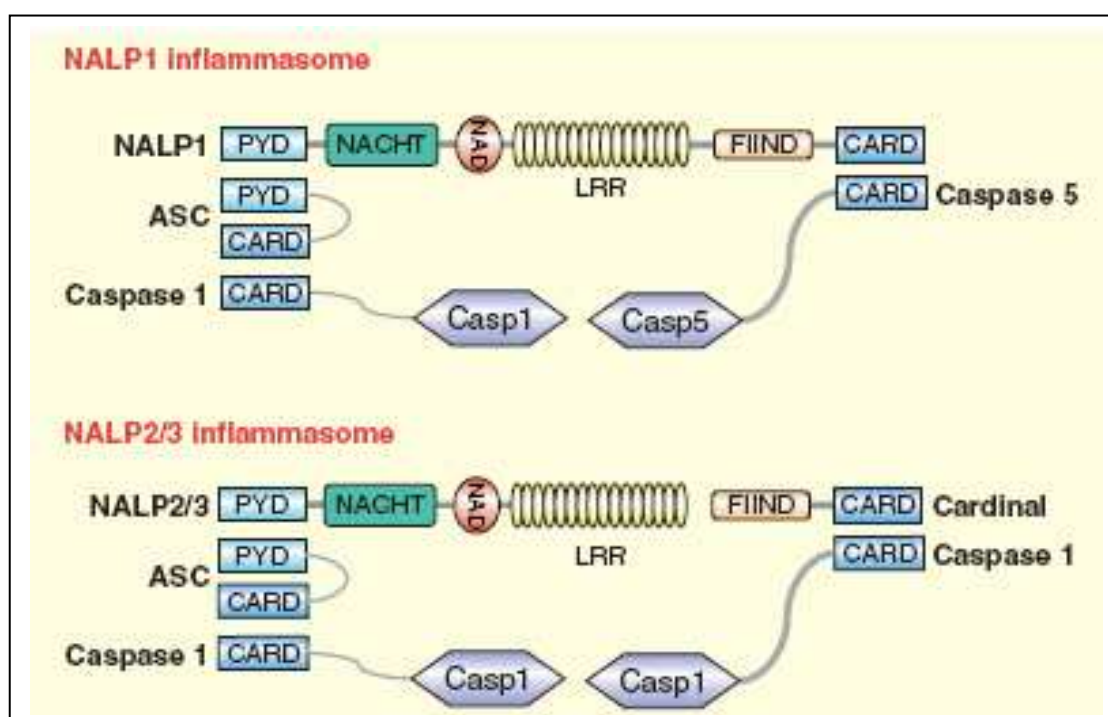


Figura 14) Struttura degli inflammasomi. Le proteine NALP sono i componenti chiave che costituiscono l'inflammasoma. La loro sequenza amminotermine è caratterizzata dalla presenza di un dominio di pirina (PYD) seguito da un dominio NACHT, da un dominio NACHT associato (NAD) e da una serie di ripetizioni ricche di leucine (LRRs). Il dominio NACHT è responsabile della oligomerizzazione degli inflammasomi. NALP1 contiene in aggiunta un dominio FIIND, dalla funzione sconosciuta, e un dominio di reclutamento della caspasi (CARD), entrambi questi costituenti sono assenti nelle altre proteine NALP.

Le proteine appartenenti a NALP sono in grado di interagire con ASC attraverso interazioni tra pirine (PYD-PYD).

ASC è una proteina di 22 kDa che contiene un dominio CARD carbossiterminale ed uno PYD amminoterminalmente. Il PYD di ASC interagisce con il PYD di diversi NALP, mentre CARD recluta il CARD della pro-caspasi-1. Tale legame si è visto essere in grado di indurre il processamento e l'attivazione della pro-IL-1 β .

La proteina ASC insieme a NALP1, alla caspasi-1 e -5 costituiscono l'inflammasoma definito NALP1, mentre l'inflammasoma definito come NALP 2/3 è costituito in aggiunta a NALP2 o 3, dalla proteina ASC, dalla caspasi-1 e dalla proteina CARDINAL (nota anche come TUCAN, CARD8, NDDP1) (**Figura 14**). Quest'ultima è un componente chiave dell'inflammasoma definito NALP2/3 poiché ha la stessa organizzazione strutturale della regione carbossiterminale di NALP1 (dominio FIIND e CARD); si è osservato, inoltre, come in alcuni tipi di cancro, la proteina CARDINAL sia overespressa (Razmara et al., 2002).

L'inflammasoma è una "piattaforma" molecolare che viene utilizzata per l'attivazione delle caspasi proinfiammatorie. L'associazione di NALP ad ASC, attraverso la via del dominio di pirina, seguita dal reclutamento attraverso CARD, della caspasi-1 e -5 determina l'attivazione di queste ultime con il conseguente taglio dei substrati per le citochine pro-infiammatorie IL-1 β e IL-18 (**Figure 15**).

I diversi componenti che costituiscono l'inflammasoma si assemblano e funzionano a livello del citoplasma.

Molto poco si conosce riguardo agli stimoli naturali che inducono l'assemblaggio dell'inflammasoma; similmente ai recettori "Toll-like" l'attivazione di questa struttura avviene attraverso il riconoscimento di "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs) attraverso i domini ripetuti ricchi di leucina (LRRs) delle proteine NALP. Il solo componente batterico ad oggi conosciuto, in grado di attivare l'inflammasoma NALP3, è il

muramil dipeptide (MDP), un prodotto di degradazione dei peptidoglicani della parete batterica.

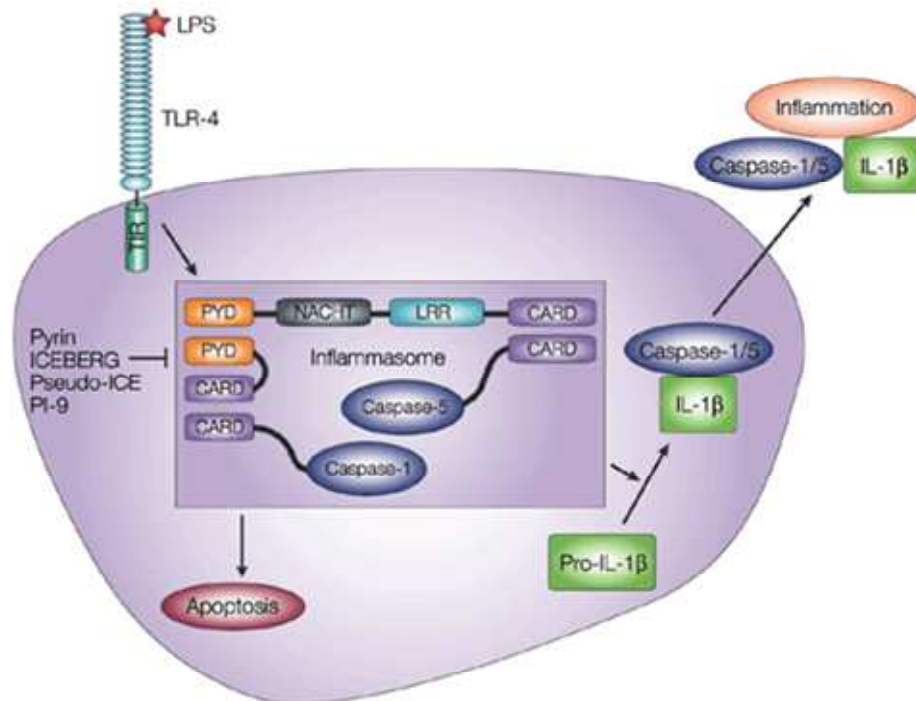


Figura 15) Modello dell'attivazione e secrezione delle caspasi proinfiammatorie e dell'interleuchina-1β indotta da lipopolisaccaride. Il reclutamento del recettore "Toll-like" (TLR)-4 da parte dell'LPS induce l'assemblaggio dell'inflammasoma contenente la proteina NALP1, con conseguente attivazione delle caspasi proinfiammatorie-1 e -5 e taglio della pro-interleuchina-1β.

Studi recenti indicano che l'inflammasoma definito come NALP3, possa essere attivato da "danger signals" endogeni, così come in associazione a stimoli patogeni (Kanneganti et al., 2006; Mariathasan et al., 2006).

E' noto come macrofagi stimolati con LPS e successivamente trattati con dosi massicce di ATP siano in grado di rilasciare la citochina IL-1β (Ferrari et al., 2006). Gli effetti dell'ATP sono mediati da un recettore ionotropico, P2X₇, il quale una volta attivato è in grado di causare un rapido efflusso di ioni potassio a livello citoplasmatico, con

conseguente permeabilizzazione della membrana plasmatica, questo determinerebbe poi, l'attivazione della caspasi e del NALP3-inflammasoma (**Figura 16**).

Altri studi farmacologici suggeriscono che questo “pathway” sia mediato dal rilascio di calcio dai depositi intracellulari, da fosfolipasi A2 calcio-indipendenti e da proteine tirosin-chinasi AG-126 sensibili (Kanneganti et al., 2006).

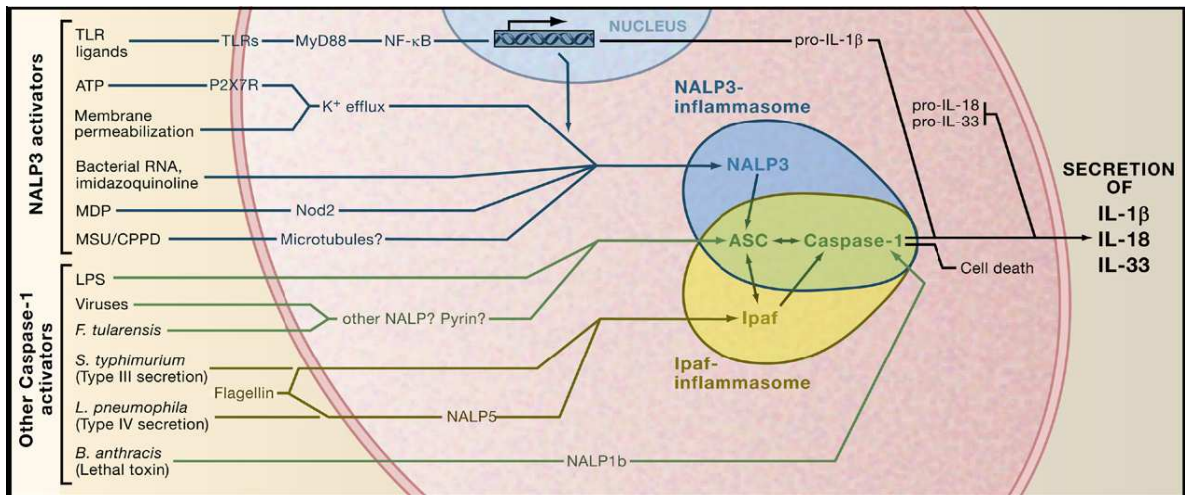


Figura 16) Vie di attivazione della caspasi-1. Diversi componenti batterici e molecole endogene, rilasciate da cellule danneggiate, attivano la caspasi-1 attraverso l'azione del NALP3-inflammasoma.

LO IONE CALCIO COME SECONDO MESSAGGERO

Lo ione calcio viene considerato un secondo messaggero in quanto è in grado di trasmettere alla macchina biochimica, posta all'interno della cellula, i messaggi elettrici e chimici che giungono alla superficie della membrana plasmatica. Una variazione della concentrazione citoplasmatica dello ione calcio ($[Ca^{2+}]_c$), infatti, è in grado di innescare eventi biologici estremamente diversi, tra cui la contrazione muscolare, la secrezione, il movimento, la fecondazione, la morte cellulare. (Gieber et al., 2000; Neal et al., 2003).

Il calcio presenta quindi, caratteristiche chimico-fisico peculiari e si presta, molto più di altri ioni, a formare legami forti e specifici con le proteine bersaglio.

Gli ioni cloro (Cl^-) e potassio (K^+), ad esempio, presentano un raggio ionico relativamente grande, che male si adatta ai potenziali siti di legame presenti sulle proteine.

Lo ione Na^+ , al contrario, possiede un raggio ionico inferiore a quello del potassio e simile al calcio, ma presentando una singola carica elettrica, forma con le proteine, complessi piuttosto deboli. Infine, rispetto al Mg^{2+} , altro ione divalente abbondante nei liquidi biologici, il calcio si adatta meglio ai siti di legame delle proteine, che sono di forma irregolare, grazie alle sue maggiori dimensioni e al numero variabile di legami di coordinazione che può stabilire.

Nonostante una concentrazione extracellulare di 1-2 mM ed un potenziale di membrana negativo verso l'interno e variabile da 10 a 70 mV, che porterebbero la $[Ca^{2+}]_c$ all'equilibrio termodinamico a valori di circa 0.1-0.2 M, la concentrazione citoplasmatica di calcio nelle cellule eucarioti a riposo, varia da circa 50 nM a 100 nM a seconda del tipo cellulare. Il mantenimento di una tale differenza di concentrazione tra l'interno e l'esterno, nonché il rapido incremento della $[Ca^{2+}]_c$ (10-20 volte in pochi millisecondi) che si osserva in seguito a stimolazione con un agonista, è il risultato dell'azione coordinata di diversi meccanismi che comprendono: le vie di influsso ed efflusso del calcio attraverso la

membrana citoplasmatica, i sistemi tampone e i depositi intracellulari di calcio (“intracellular stores”).

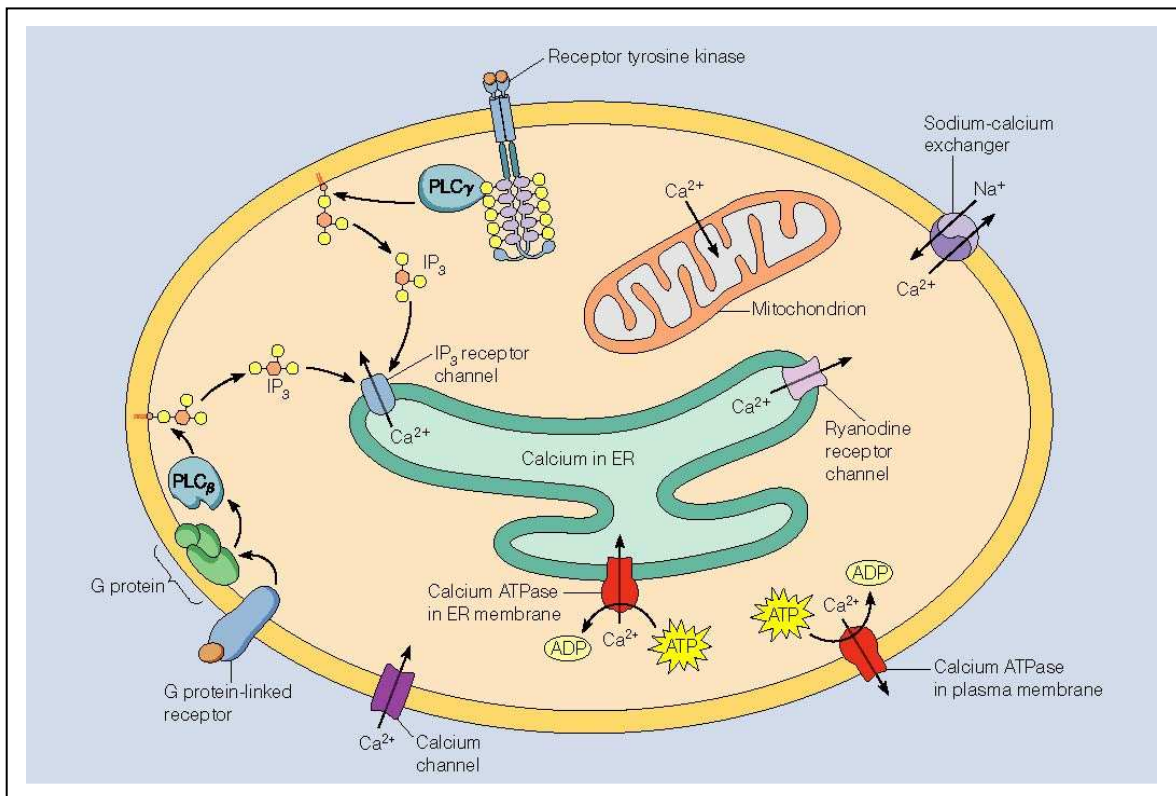


Figura 17) Omeostasi intracellulare del calcio. Lo svuotamento dei depositi intracellulari, insieme all’influsso a livello della membrana plasmatica, rappresentano la via con cui si attuano rapidi aumenti della concentrazione di Ca^{2+} citoplasmatico, che torna poi a livelli presenti nella cellula a riposo. Tali processi inversi sono rappresentati dal riaccumulo nei depositi intracellulari mediato dalle pompe ATPasiche di Golgi e reticolo endoplasmatico e l’efflusso, attraverso la membrana plasmatica, mediato, oltre che dalle già citate pompe ATPasiche, anche dall’antiporto Na^{+}/Ca^{2+} .

Canali calcio a livello della membrana plasmatica

L’ingresso del Ca^{2+} dall’ambiente extracellulare avviene attraverso canali presenti a livello della membrana plasmatica. Questi canali sono costituiti da proteine che mettono in comunicazione il citoplasma con l’esterno della cellula.

Tali canali possono essere divisi in due categorie, in base al meccanismo che controlla la transizione dalla forma “aperta” a quella “chiusa”.

1. Canali a controllo di ligando

Sono presenti in tutte le cellule, richiedono per la loro attivazione, e quindi per l'apertura, l'esistenza di un segnale extracellulare di natura chimica (ligando). Tali canali possono essere ulteriormente suddivisi in base al loro meccanismo d'attivazione in:

– **ROCCs** (Receptor-Operated Ca^{2+} Channels)

Si tratta di canali Ca^{2+} regolati da recettore; in questi canali il sito di legame del ligando ed il canale sono compresi nella stessa proteina o fanno parte dello stesso complesso. Questi canali si aprono in seguito al legame dell'agonista con il recettore, senza l'intervento di secondi messaggeri diffusibili. Un esempio è rappresentato dai canali nicotinici, glutammato e da quelli attivati da ATP extracellulare di tipo P2X.

– **GOCCs** (G protein-Operated Ca^{2+} Channels)

Canali la cui attivazione è mediata da proteine G.

– **SMOCCs** (Second Messenger-Operated Ca^{2+} Channels)

Canali attivati da un secondo messaggero. L'apertura di questi canali è controllata da un messaggero citosolico diffusibile, la cui produzione è dovuta all'interazione ligando-recettore.

– **SOCCs** (Stores-Operated Ca^{2+} Channels)

Canali attivati dallo svuotamento dei depositi intracellulari. Il meccanismo d'attivazione di tali canali è ancora incerto: attualmente il modello favorito è quello che prevede l'azione di un secondo messaggero solubile denominato CIF (Ca^{2+} influx factor).

2. Canali a controllo di potenziale (VOCCs)

La loro presenza è stata accertata sia in cellule eccitabili, come per esempio le cellule nervose e le fibre muscolari, sia in cellule non eccitabili, come i fibroblasti. L'apertura di tali canali si ha in seguito a depolarizzazione della membrana plasmatica.

I VOCCs, accomunati dall'elevata affinità per il Ca^{2+} , possono essere distinti in diverse classi in base alle caratteristiche elettrofisiologiche ed alla sensibilità a inibitori diversi, rendendo così conto della complessità e peculiarità funzionale di tali canali nei diversi tipi cellulari.

Meccanismi di estrusione del calcio

L'efflusso di Ca^{2+} attraverso la membrana plasmatica avviene tramite due differenti sistemi: la pompa per il calcio ATP-dipendente (o Ca^{2+} ATPasi) e lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La Ca^{2+} ATPasi che si trova nella membrana plasmatica di tutte le cellule eucarioti e di cui costituisce approssimativamente lo 0.1% delle proteine totali, rappresenta la principale via d'estrusione del Ca^{2+} nelle cellule eccitabili e viene attivata tramite l'interazione con il complesso Ca^{2+} -calmodulina.

Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, essenziale solo nelle cellule eccitabili, rappresenta un sistema elettrogenico e quindi sensibile al potenziale di membrana. Esso infatti, promuove lo scambio di Na^+ e Ca^{2+} secondo un rapporto stechiometrico di 3:1, alterando di conseguenza la distribuzione di carica ai due lati della membrana. Rispetto alla Ca^{2+} ATPasi è un sistema a minore 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

Nel corso degli anni '80 lo studio dell'omeostasi del calcio ha dimostrato che gli aumenti di questo secondo messaggero, indotti da una varietà di stimoli, sono generati da due meccanismi diversi: l'ingresso di calcio dal mezzo extracellulare e il rilascio di calcio da organelli intracellulari. Candidati a questo ruolo erano i mitocondri, dei quali era nota la capacità di accumulare Ca^{2+} nella matrice grazie all'ampio gradiente. Due osservazioni tuttavia, ne hanno rapidamente escluso un ruolo in questi processi:

- 1) la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ a riposo è infatti compresa tra 50-100 nM, ed in queste condizioni è noto che i mitocondri non accumulano quantità rilevanti di Ca^{2+} ;
- 2) la liberazione di Ca^{2+} accumulato nei mitocondri (ad esempio con agenti disaccoppianti, che collassano il potenziale di membrana mitocondriale, e con esso il gradiente elettrochimico per l'accumulo del Ca^{2+}) non riduce gli aumenti della $[\text{Ca}^{2+}]_c$ indotti dalla successiva stimolazione con un agonista, dimostrando così che i depositi di Ca^{2+} scambiabile risiedono in altre strutture cellulari.

Un modello per queste osservazioni è stato il muscolo scheletrico, in cui l'ordinata struttura morfologica e le conoscenze sulle variazioni dinamiche del Ca^{2+} hanno permesso di dirigere l'attenzione su una particolare regione, la triade, in cui è presente una struttura specializzata, la cisterna terminale del reticolo sarcoplasmatico, che risponde alla depolarizzazione della membrana plasmatica (trasmessa dai tubuli T) rilasciando Ca^{2+} dal suo interno (Lamb e Stephenson, 1992). Come era possibile prevedere su base teorica, il reticolo sarcoplasmatico contiene tre proteine indispensabili alla rapida assunzione e liberazione di Ca^{2+} :

- una pompa ATPasica, ossia una proteina in grado di accumulare Ca^{2+} nel reticolo contro gradiente di concentrazione,

- un canale attivabile in grado di rilasciare rapidamente, durante la stimolazione, il Ca^{2+} accumulato,
- una proteina di legame, che permette l'accumulo di grandi quantità di Ca^{2+} , senza generare un gradiente di concentrazione troppo ampio (il cui mantenimento avrebbe un costo energetico molto alto). Questa proteina, la calsequestrina, ha un'alta capacità di legare lo ione (lega molto Ca^{2+}), ma bassa affinità (libera cioè rapidamente il Ca^{2+} quando il canale si apre).

Queste tre classi di proteine, sono anche presenti nei depositi delle cellule non muscolari, esse possono essere isoforme delle proteine sopra descritte (come nel caso delle ATPasi) o proteine con caratteristiche molto diverse, ma funzione analoga. In particolare, il canale di rilascio possiede un sistema di attivazione assai diverso, è noto infatti che il Ca^{2+} viene liberato dai depositi intracellulari ad opera dell'Inositolo 1,4,5 trifosfato (IP_3), rilasciato a sua volta da un fosfolipide della membrana plasmatica (il fosfatidil-inositolo-4,5-bisfosfato) per azione di fosfolipasi C. L' IP_3 agisce come secondo messaggero legandosi al suo recettore localizzato a livello della membrana del reticolo endoplasmatico (Berman, 1999).

Tale recettore funziona come un canale del calcio attivato dal legame dell' IP_3 , che determina la liberazione dello ione dal lume del reticolo endoplasmico e del Golgi. Questa liberazione di calcio possiede la proprietà fondamentale di dipendere in maniera bifasica dalla $[\text{Ca}^{2+}]_c$: a concentrazioni basse ($<0.3 \mu\text{M}$) il Ca^{2+} agisce come un co-agonista dell' IP_3 (esercitando dunque un retrocontrollo positivo sulla propria liberazione dal reticolo endoplasmatico); mentre a concentrazioni più elevate esercita un retrocontrollo negativo sulla liberazione di Ca^{2+} indotta dall' IP_3 , inibendo il recettore e impedendo così ulteriore rilascio di Ca^{2+} .

Esistono inoltre depositi intracellulari di Ca^{2+} insensibili all' IP_3 funzionalmente distinguibili in due tipi: i primi sensibili a caffeina, una delle caratteristiche farmacologiche tipiche del canale del reticolo sarcoplasmatico. I secondi, rappresentati dal complesso del Golgi, dalle vescicole secretorie e da altri organuli citoplasmatici, che, benché contengano una quantità consistente di Ca^{2+} , non sono in equilibrio dinamico con il citosol e quindi svolgono un ruolo marginale nel controllo della $[\text{Ca}^{2+}]_c$.

Sistemi tampone per il calcio

All'interno della cellula eucariote esistono, inoltre, sistemi in grado di tamponare transitoriamente ampi aumenti della $[\text{Ca}^{2+}]_c$ che potrebbero portare all'attivazione di reazioni enzimatiche deleterie per la cellula.

Questi sono costituiti da un insieme di proteine, estremamente eterogeneo per affinità e capacità di legame con il Ca^{2+} , che nella cellula svolgono un'azione enzimatica Ca^{2+} -dipendente (per esempio le fosforilasi) o regolatoria (per esempio la calmodulina). Quest'ultima svolge un ruolo importante nella modulazione di una varietà di processi fisiologici (quale l'attività della Ca^{2+} -ATPasi di membrana), oltre a rappresentare la proteina citoplasmatica più importante nel legare Ca^{2+} , in virtù della sua elevata concentrazione (pari a circa l'1% delle proteine cellulari totali) e della presenza in essa di quattro siti di legame per il Ca^{2+} .

SCOPO DELLA TESI

Scopo della tesi è quello di caratterizzare le risposte P2 mediate in due tipi cellulari: i cheratinociti e i macrofagi umani.

Per quanto riguarda i cheratinociti umani si vuole dapprima caratterizzare i recettori P2 espressi in questo tipo cellulare e successivamente analizzarne le risposte funzionali.

Inoltre, poiché citochine quali IL-4 e IFN- γ , risultano essere importanti in alcune patologie che coinvolgono le cellule della cute (psoriasi e dermatite atopica), si cercherà di valutarne gli effetti sull'espressione e sulle funzionalità dei recettori P2 (Roland, 2003).

Successivamente verranno caratterizzate le risposte mediate dai recettori P2 nei macrofagi umani, studiando il rilascio di microvescicole indotto dalla stimolazione con nucleotidi extracellulari e cercando di stabilire:

- quale tipo di recettore P2 sia coinvolto nel processo di microvescicolazione;
- se il fenomeno sia calcio dipendente;
- se le microvescicole contengano la citochina pro-infiammatoria IL-18;
- il possibile coinvolgimento delle caspasi in tale fenomeno;
- e l'eventuale presenza delle diverse proteine che costituiscono il complesso dell'inflammasoma, all'interno delle microvescicole.

MATERIALI E METODI

Reagenti

Il PBS (“phosphate buffer saline”) e l’RPMI-1640 sono stati acquistati da Celbio (Milano, Italia). Il 2’,3’-(4-benzoyl-benzoyl)-ATP (BzATP), l’ATP ossidato (oATP), l’endotossina batterica (LPS) estratta da *Escherichia coli* (sierotipo 055:B5), benzamidina, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), l’EGTA e l’albumina di siero bovino (BSA) sono stati acquistati presso Sigma-Aldrich (Milano, Italia). ATP e UTP sono stati acquistati dalla Roche (Milano, Italia); EDTA dalla Baker (J. T. Baker, NJ, USA), il siero umano dalla Sigma (Germania). Il Ficoll è stato acquistato da Pharmacia (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden). Il KGM Bulletkit dalla Cambrex (Milano, Italia); la tripsina-EDTA 1X dalla Gibco (Milano, Italia).

Il kit ELISA dalla Medical & Biological Laboratories Co. (Nagoya, Giappone). Il tetrapeptide Y-VAD (Tyr, Val, Ala, Asp) dalla Bachem (Milano, Italia).

Colture cellulari

- **Cheratinociti**

Le colture primarie di cheratinociti umani sono state fornite dall’Istituto Dermopatico dell’Immacolata di Roma e mantenute in coltura.

I cheratinociti sono stati mantenuti in terreno serum-free “Keratinocyte Growth Medium™” (KGM; Cambrex, Milano) preparato aggiungendo alla soluzione essenziale 10 ng/ml EGF, 0.4 µg/ml idrocortisone, 5 µg/ml insulina, 2 ml “bovine pituitary extract” e antibiotici.

Per tutti gli esperimenti i cheratinociti sono stati usati al secondo o terzo passaggio; raggiunta la confluenza dell’80% sono stati staccati utilizzando una soluzione contenente

0.05% tripsina più 0.02% EDTA, poi trattati con 100 U/ml IFN- γ o IL-4 e infine con gli agonisti dei recettori P2.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti su cheratinociti provenienti da tre diversi donatori.

- **Macrofagi**

I monociti umani sono stati isolati da "buffy coats" (gentilmente forniti dalla Banca del Sangue, Arcispedale S. Anna, Ferrara) e purificati tramite gradienti su Ficoll (Sallusto e Lanzavecchia, 1994). Per differenziare i monociti a macrofagi, le cellule sono state mantenute in coltura per 6 giorni in terreno RPMI-1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA); dopo di che sono state lavate con PBS e staccate utilizzando PBS freddo contenente 2 mM EDTA. I macrofagi sono stati infine raccolti, centrifugati, risospesi in terreno, contati e seminati in fiasche T75 (Falcon) o petri (Bibby Sterilin, Stone, UK), ad una densità di circa 6×10^6 cellule/fiasca e mantenuti a 37°C in presenza di 5% CO₂.

Microscopia

I cheratinociti o i macrofagi sono stati staccati dalle petri/fiasche e in seguito mantenuti in coltura (2×10^5) su vetrini di 24 mm di diametro (Merck Eurolabs, Lutterworth, UK). Gli esperimenti sono stati condotti in una soluzione salina standard, contenente 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES, 5.5 mM glucosio, 5 mM NaHCO₃ e 1 mM CaCl₂, pH 7.4 con NaOH. I macrofagi sono stati stimolati anche in soluzioni saline non contenenti Na⁺, in cui lo ione è stato sostituito dal saccarosio (300 mM saccarosio, 1 mM K₂HPO₄, 1 mM MgSO₄, 5.5 mM glucosio e 20 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, pH 7.4 con KOH) o dal K⁺ (130 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM glucosio, 5 mM KHCO₃, 20 mM HEPES, 1 mM CaCl₂, pH 7.4 con KOH).

Le modificazioni morfologiche e il rilascio di microvescicole sono stati analizzati montando i vetrini in una camera Leyden, termostata a 38°C (modello TC-202A; Medical Systems Corporation, NY), posta sullo stativo di un microscopio invertito Nikon Eclipse TE300 (Nikon, Tokyo, Giappone).

Le immagini sono state acquisite tramite una camera CCD (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA) utilizzando il software Metamorph (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA, USA).

I macrofagi per l'analisi al microscopio elettronico sono stati staccati dalle fiasche con PBS freddo contenente 2 mM EDTA e i "pellets" cellulari sono stati fissati con 2.5% glutaraldeide. I campioni per l'osservazione al microscopio elettronico sono stati preparati dal Centro di Microscopia Elettronica dell'Università di Ferrara.

Purificazione delle microvescicole

Per la caratterizzazione delle microvescicole, i macrofagi sono stati seminati in fiasche T75 a una concentrazione di 7×10^6 cellule/fiasca e stimolati in soluzione salina a diversa composizione ionica con 200 μ M BzATP, per 10 min a 37°C. Dopo stimolazione, la soluzione salina contenente le vescicole è stata addizionata degli inibitori delle proteasi PMSF e benzamidina, e 1mM EDTA. La soluzione è stata inizialmente centrifugata a 160 x g per 5 min con una Heraeus Centrifuge con rotore CWS T110-S342 (Thermo Electron Corporation, Cologno Monzese) al fine di eliminare le cellule in sospensione e i detriti cellulari. Le microvescicole sono state in seguito purificate centrifugando i surnatanti a 100000 x g per 90 min, a 4°C, con ultracentrifuga Beckman L8-M (Beckman Coulter SpA, Milano; rotore 70Ti). I "pellets" di microvescicole sono stati risospesi in una soluzione salina ad elevato contenuto di saccarosio contenente gli inibitori delle proteasi PMSF e benzamidina.

La quantificazione del rilascio delle microvescicole in assenza di Ca^{2+} extracellulare è stata effettuata stimolando i macrofagi in soluzione salina contenente saccarosio, in assenza di CaCl_2 e in presenza di 0.5 mM EGTA.

Misurazione dell'espressione della citochina IL-18

La presenza della citochina IL-18 è stata analizzata in macrofagi e in microvescicole isolate dalla stimolazione degli stessi, utilizzando un kit ELISA (Minneapolis, MI, USA), secondo le istruzioni fornite dalla ditta.

Le microvescicole sono state inizialmente lisate attraverso azoto liquido e la concentrazione proteica è stata poi misurata utilizzando il metodo Bradford, che prevede l'utilizzo del Comassie Blu, il quale è in grado di legarsi ai residui di arginina in forma anionica. Il legame con le proteine determina il viraggio verso il blu con un'intensità proporzionale alla quantità di proteina legata. I campioni vengono diluiti in 2 ml di colorante e la lettura della loro assorbanza viene fatta attraverso uno spettrofotometro (Ultrospec 3000, UV/Spectrophotometer, Pharmacia Biotech) ad una lunghezza d'onda di 595 nm.

Analisi dell'espressione delle proteine tramite Western blot

La concentrazione proteica dei campioni è stata misurata con il metodo Bradford. I campioni sono stati solubilizzati in soluzione O (10% p/v glicerolo, 5% v/v 2-mercaptoetanolo, 2.3% p/v SDS, 62.5 mM Tris, 0.003% blu di bromofenolo). Le proteine sono state separate utilizzando un gel al 7.5% o al 12% di acrilammide e in seguito trasferite su membrana di nitrocellulosa (Schleicher and Schull, Legnano).

Per il Western blot per i recettori P2X₇ e P2Y₁, per IL-18, NALP, ASC, CARDINAL e la caspasi-1 i siti aspecifici sono stati bloccati incubando la membrana per 1 h con tampone TBS (10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 8.0) contenente 10% latte scremato.

L'incubazione con l'anticorpo primario è stata effettuata *overnight*; gli anticorpi anti-P2X₇, anti-NALP, anti-ASC, anti-CARDINAL e anti-caspasi-1 sono stati diluiti in TBS-T (TBS addizionato di 0.1% Tween 20), mentre l'anticorpo anti-IL-18 e anti-P2Y₁ sono stati diluiti in TBS + 1% BSA.

L'anticorpo primario anti-P2X₇ è stato acquistato dalla Calbiochem, mentre quello anti-P2Y₁ dalla Alomone. L'anticorpo primario anti-IL-18 è stato acquistato dalla Chemicon, quello anti-NALP dalla Alexis, quello anti-ASC dalla MBL mentre quello anti-CARDINAL dalla Vinci-Biochem, infine l'anti-caspasi-1 è stato acquistato dalla upstate. Gli anticorpi secondari utilizzati erano coniugati alla perossidasi.

Misurazione delle variazioni di concentrazione del Ca²⁺ intracellulare

Il fura-2/AM (Molecular Probes, Leiden, Olanda) è un indicatore fluorescente che permette di misurare la [Ca²⁺]_c, poiché viene intrappolato nel citoplasma ed è scarsamente permeabile attraverso la membrana del reticolo endoplasmatico e dell'apparato di Golgi. Si tratta di un derivato benzofuranico che presenta un sito di legame con caratteristiche strutturali simili all'EGTA, un chelante del calcio, in grado di legare lo ione con affinità molto maggiore di Mg²⁺ e Mn²⁺.

Il fura-2/AM lega il calcio nel rapporto stechiometrico di 1:1. Il legame porta alla formazione di un complesso in grado di indurre un incremento dell'intensità di emissione di fluorescenza a 500 nm di circa tre volte e contemporaneamente uno shift verso il blu dello spettro di eccitazione (la lunghezza di massima eccitazione passa da 380 a 340 nm).

Il fura-2 è una molecola idrofobica, non lipodiffusibile, di conseguenza non in grado di

attraversare la membrana plasmatica. Per permettere all'indicatore fluorescente di entrare nelle cellule sono stati mascherati i cinque gruppi carbossilici con residui acetossimetilestere. Il derivato esterificato permea facilmente attraverso la membrana e nel citoplasma viene idrolizzato da esterasi specifiche, ristabilendo così la forma pentacarbossilata che rimane intrappolata nel citosol.

I cheratinociti umani di controllo e quelli pre-trattati con le citochine vengono fatti aderire su vetrini di 10 x 30 mm (Vetrotecnica, Padova, Italia). Al raggiungimento della confluenza le cellule vengono incubate con 4 μM fura per 15-30 minuti a 37°C in una soluzione salina contenente 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 20 mM HEPES, 5.5 mM glucosio, 5 mM NaHCO_3 , pH 7.4 a cui viene aggiunto 1 mM CaCl_2 e 250 μM sulfinpyrazone (SP).

L'SP è un inibitore dei trasportatori degli anioni organici presenti nella cellula e impedisce l'estruzione dell'indicatore.

Allo scadere dell'incubazione le cellule vengono lavate e mantenute in salina contenente 1 mM CaCl_2 e 250 μM SP fino al momento dell'utilizzo. La misurazione della variazione del calcio intracellulare viene eseguita introducendo ciascun vetrino in una cuvetta di vetro ottico, dotata di agitazione e termostatazione. Le variazioni della $[\text{Ca}^{2+}]_c$ in assenza di calcio extracellulare sono state eseguite utilizzando una salina priva di CaCl_2 , e contenente 0.5 mM EGTA.

L'avvenuto intrappolamento del fura-2 nelle cellule viene verificato con l'aggiunta, al termine dell'esperimento, di 100 nM ionomicina, un Ca^{2+} ionoforo che permette l'ingresso massivo di Ca^{2+} nella cellula, Ca^{2+} che può legare il fura-2 se presente a livello citosolico.

Le misurazioni sono state effettuate utilizzando le seguenti lunghezze d'onda:

eccitazione: 340 e 380 nm;

emissione: 509 nm.

Estrazione e quantificazione dell'RNA

L'RNA totale è stato estratto dai cheratinociti utilizzando RNazol BTM (TEL-TEST, Friendswood, Tex., USA), un composto contenente isotiocianato di guanidina e fenolo acido che consente di separare l'RNA totale da DNA e proteine.

Il sale di guanidina ad elevata concentrazione dissolve i complessi nucleo-proteici causando una modificazione della struttura secondaria delle proteine e limitando la possibilità di legame tra RNA e proteine. Il fenolo, invece, a pH acido trattiene in fase organica il DNA genomico. Viene così promossa la formazione di complessi tra RNA, isotiocianato di guanidina e molecole d'acqua, ed abolita l'interazione idrofilica di DNA e proteine.

L'RNA viene estratto dai cheratinociti lisando direttamente le cellule adese con RNazol BTM; il lisato cellulare viene passato per 4-5 volte attraverso l'ago di una siringa da insulina allo scopo di frammentare il DNA genomico. All'omogenato viene aggiunto cloroformio. Seguono un'agitazione vigorosa di 15 secondi e un'incubazione di 5 minuti in ghiaccio. Il campione viene poi centrifugato in microcentrifuga a 1400 rpm a 4°C per 15 minuti, ottenendo una separazione in due fasi: una fase superiore acquosa, nella quale si trova l'RNA e una fase inferiore organica, nella quale si localizza prevalentemente il DNA. All'interfaccia tra le due fasi si localizzano le proteine. Si preleva la parte superiore trasferendola in un nuovo tubo e si precipita l'RNA aggiungendo un uguale volume di isopropanolo e centrifugando a 1400 rpm per 15 minuti. Il pellet di RNA viene successivamente sottoposto a due lavaggi con etanolo 70% e centrifugato a 8000 rpm per 8 minuti; l'etanolo viene quindi scartato e il pellet asciugato leggermente a temperatura ambiente. L'RNA totale così ottenuto viene quantificato tramite uno spettrofotometro.

La concentrazione dell'RNA del campione viene ottenuta applicando la seguente formula:

$$OD_{260} \times 40 \times f.d. = \text{concentrazione dell'RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Dove:

OD_{260} = assorbanza del campione a 260 nm

40 = $\mu\text{g/ml}$ di RNA che hanno un densità ottica (OD) pari a 1

f.d. = fattore di diluizione

1 μg di RNA totale viene sottoposto a corsa elettroforetica su gel all'1% di agarosio colorato con 0.8 $\mu\text{g/ml}$ etidio bromuro (Sigma, Milano, Italia). Il legame dell'etidio con RNA lo rende visibile se illuminato con luce ultravioletta. Se l'RNA è integro si individuano nel gel 3 bande corrispondenti all'RNA ribosomiale: 28S, 18S e 5S.

RT-PCR

Vengono utilizzati 200 ng di RNA/campione (Access RT-PCR kit, Promega Corporation Madison, Wi, USA) con il Thermal Cycler UNO Biometria (Biometria Inc. Tampa, FL).

Per la reazione di retrotrascrizione vengono utilizzati come innesco, primers specifici per ogni rispettivo recettore (riportati nella **Tabella 3**). Le condizioni per l'amplificazione tramite PCR sono: 30 cicli con temperatura di denaturazione di 95°C per 45 secondi e 72°C per 30 secondi per l'estensione.

I prodotti della PCR (20 μl /campione) vengono poi separati in gel al 2% agarosio e contenente etidio bromuro, quindi fotografati con pellicola Polaroid 667 (macchina fotografica Polaroid MP-3 Land Camera, Francia).

Trascritto	<u>PRIMERS</u>	<u>CONDIZIONI DI “ANNEALING”</u>
P2X ₁	5'-CGCCTTCCTCTTCGAGTATG-3' 5'-GGAAGACGTAGTCAGCCACA-3'	57°C, 1 min 15 s
P2X ₃	5'-GAGAGTGAGAATACCG-3' 5'-CACTGGTCCCACGCCTTG-3'	60°C, 1 min 15 s
P2X ₄	5'-TGCATTTATGATGCTAAAACAG-3' 5'-CAAGACCCTGCTCGTAATC-3'	57°C, 2 min
P2X ₅	5'-CCGGGAGCGACTTCCAGGATATAG-3' 5'- GGCATGGGATCACTGGGTGCTAGAC-3'	58°C, 1 min 14 s
P2X ₆	5'-AAAAACAGGCCAGTGTGTGGTGTTC-3' 5'- TGCCTGCCCGGTGACGAGG-ATGTCTGA-3'	60°C, 1 min 15 s
P2X ₇	5'-AGATGCTGGAGAATGGAGTG-3' 5'-TTCTCGTGGTG-TAGTTGTGG-3'	57°C, 2 min
P2Y ₁	5'-GGCAGGCTCAAGAAGAAGAAT-3' 5'-ATCACACATTTCTGGGGTCTG-3'	56°C, 1 min 50 s
P2Y ₂	5'-CCCTGCCGCTGCTGGTTTA-3' 5'-GATGGCGTTGAGGGTGTGG-3'	56°C, 1 min 50 s
P2Y ₄	5'-CGTCTTCTCGCCTCCGCTCTCT-3' 5'-GCCCTGCACTCATCCCCTTTTCT-3'	58°C, 30 s
P2Y ₆	5'-CCGCTGAACATCTGTGTC-3' 5'-AGAGCCATGCCATAGGGC-3'	58°C, 30 s
P2Y ₁₁	5'-GTGGTTGAGTTCCTGGTGGC-3' 5'-CCAGCAGGTTGCAGGTGAAG-3'	62°C, 30 s
P2Y ₁₂	5'-TTTGCCCGAATTCCTTACAC-3' 5'-ATTGGGGCACTTCAGCATAAC-3'	57°C, 30 s
P2Y ₁₃	5'-GGGCTCATAGCCTTTGACAG-3' 5'-CAGAGGCCCTTTAAGGAAG-3'	57°C, 1 min
P2Y ₁₄	5'-CACTTCAAGACGACAAACG-3' 5'-GAATATCCATCCTGACTCC-3'	57°C, 30 s
Beta-actin	5'-TGACGGGGTACCCACACTGTGCCCATCTA-3' 5'-AGTCATAGTCCGCCTAGAAGCATTGCGGT-3'	65°C, 1 min 15 s

Tabella 3) Sequenze dei primers usate nell' RT-PCR e condizioni di “annealing”.

RISULTATI

PARTE PRIMA

Cheratinociti

Espressione dell'mRNA dei recettori P2 nei cheratinociti umani

I cheratinociti umani esprimono recettori di membrana P2, attivati dai nucleotidi extracellulari. In letteratura si hanno informazioni frammentarie e incomplete riguardo l'espressione di questa famiglia di recettori. Dall'analisi eseguita in questa tesi è emerso come i cheratinociti umani esprimano l'mRNA per i sottotipi: P2X₁, P2X₃, P2X₄, P2X₅, P2X₆, P2X₇, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃.

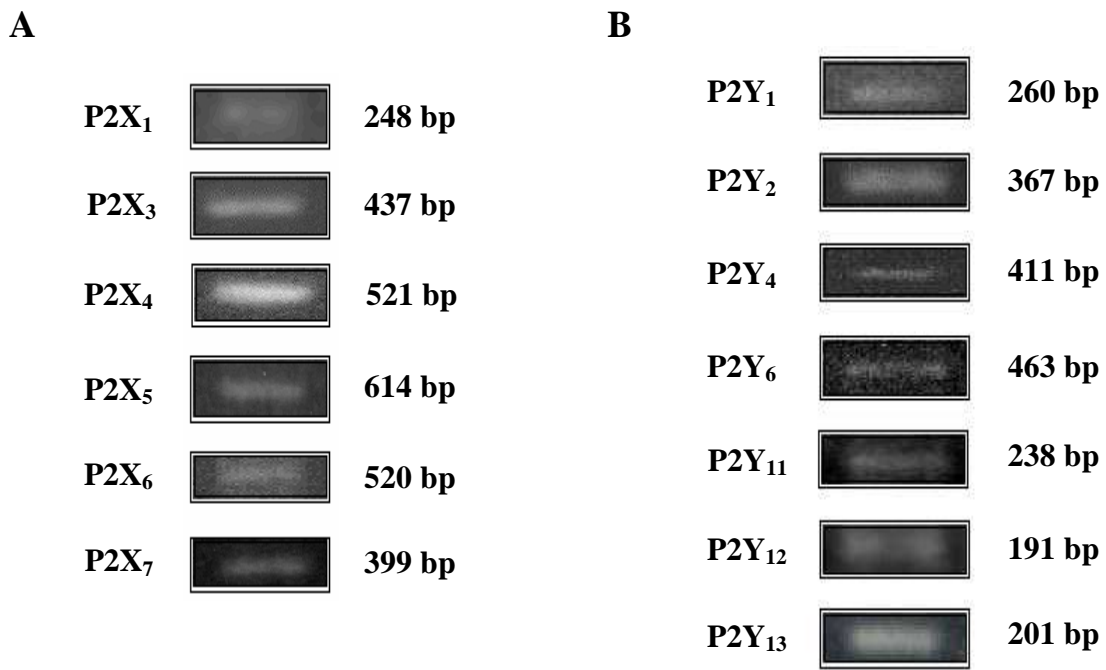


Figura 18) Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di RT-PCR dei recettori P2X (pannello A) e P2Y (pannello B) espressi da cheratinociti umani. Le reazioni di RT-PCR sono state effettuate come descritto nei Metodi.

La stimolazione con nucleoidi extracellulari determina variazioni della concentrazione del calcio intracellulare

L'espressione dei recettori P2 da parte dei cheratinociti, e soprattutto la funzionalità di tali recettori è stata studiata stimolando questo tipo cellulare con i nucleotidi extracellulari.

La **Figura 19** mostra come la stimolazione dei cheratinociti con dosi crescenti di ATP determini un rilascio di calcio intracellulare che raggiunge il suo picco massimo alla concentrazione di 30 μM ATP. Gli effetti indotti da questo nucleotide si azzerano a concentrazioni inferiori a 3 nM.

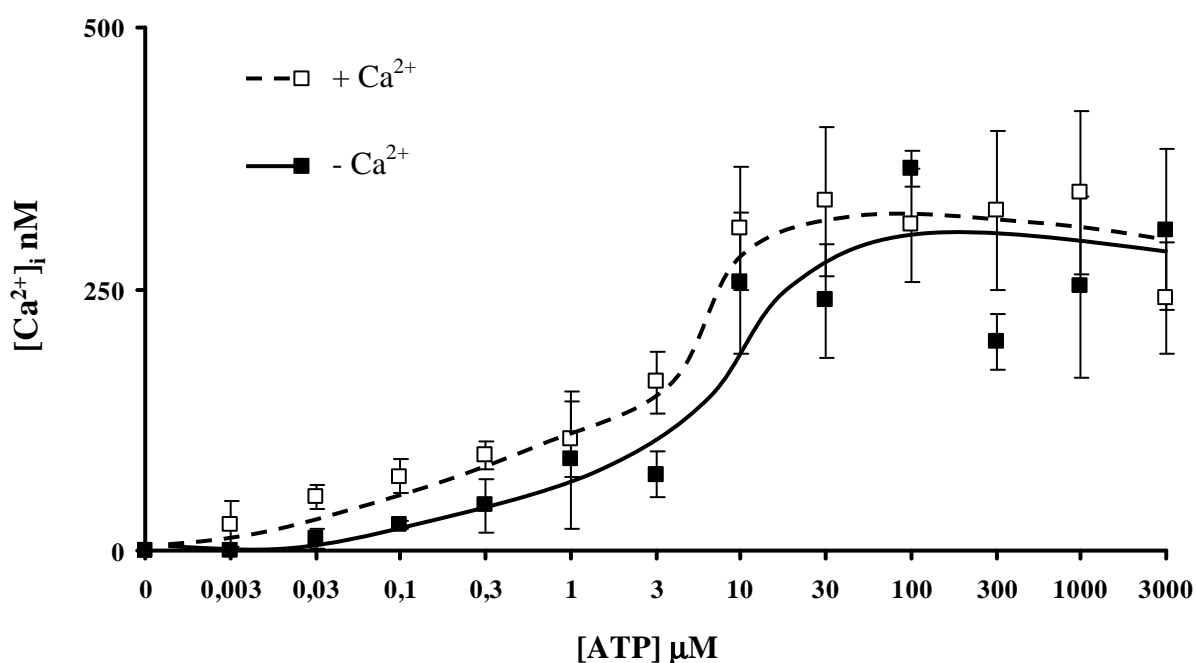


Figura 19) Curva dose-dipendenza dell'ATP. I cheratinociti sono stati caricati con l'indicatore fluorescente fura-2/AM e mantenuti in una soluzione salina contenente (linea tratteggiata) o non contenente (linea continua) 1 mM CaCl_2 , come indicato nei Metodi. Le curve sono indicative di almeno tre esperimenti indipendenti e le barre d'errore rappresentano le deviazioni standard.

Se la stimolazione viene condotta in assenza di calcio extracellulare, ma in presenza di 0.5 mM EGTA, si osserva come l'andamento della curva si modifichi. L'aumento di calcio, in queste condizioni è reso possibile solo dal rilascio di quello contenuto all'interno degli

“stores” intracellulari, poiché viene impedito l’influsso dello ione attraverso la membrana (risposta P2X-mediata), mentre è possibile osservare un eventuale aumento di $[Ca^{2+}]_i$ a seguito della stimolazione del sottotipo P2Y. In assenza di Ca^{2+} extracellulare le risposte all’ATP risultano di minore entità, così come la sensibilità al nucleotide; a 100 nM ATP si ha azzeramento nella risposta calcio.

Le variazioni della concentrazione di calcio intracellulare sono state osservate anche utilizzando nucleotidi come l’UTP, il quale è in grado di attivare i recettori P2Y.

In queste condizioni la curva dose-dipendenza risulta essere molto più spostata verso l’alto; i cheratinociti sono più sensibili a questo nucleotide che all’ATP e la massima risposta calcio si osserva a una concentrazione pari a 300 μ M UTP (**Figura 20**).

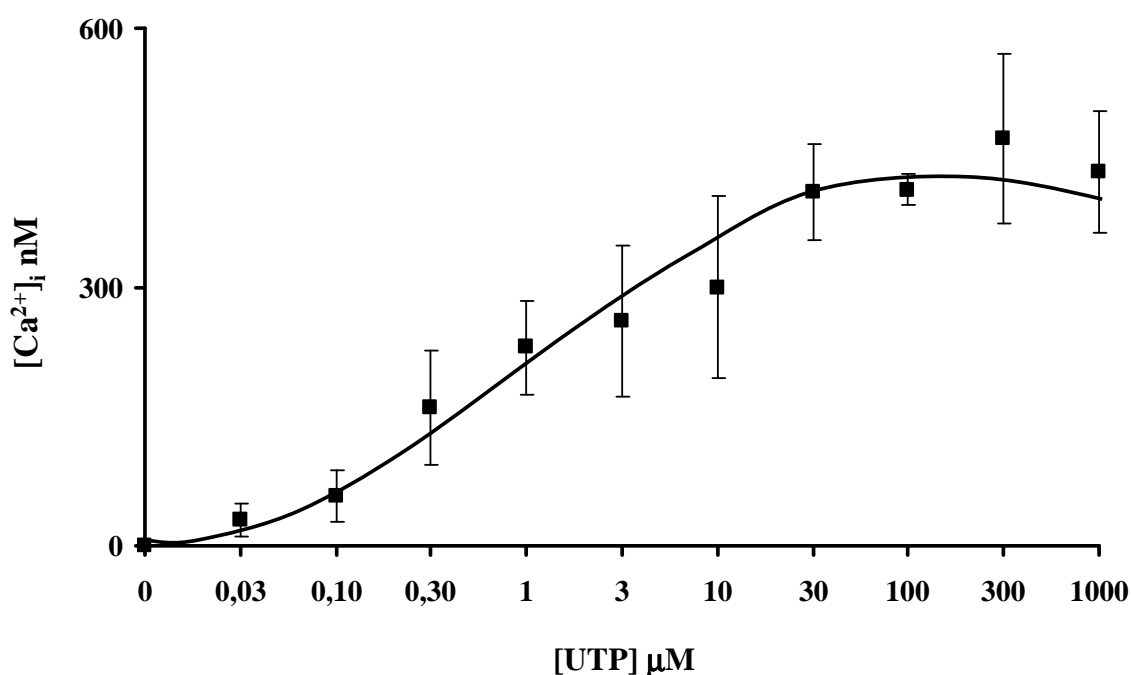


Figura 20) Curva dose-dipendenza dell’UTP. I cheratinociti sono stati caricati con l’indicatore fluorescente fura-2/AM e mantenuti in una soluzione salina contenente 1 mM $CaCl_2$, come indicato nei Metodi. La curva è indicativa di almeno tre esperimenti indipendenti e le barre d’errore rappresentano le deviazioni standard.

E' stato poi utilizzato un derivato farmacologico dell'ATP, il BzATP, che attiva preferenzialmente il recettore P2X₇ mentre è pressoché inattivo nei confronti dei recettori P2Y. In queste condizioni si osserva come la curva dose-dipendenza sia molto scacchiata verso l'asse delle x, e come le risposte calcio diventino consistenti ad una concentrazione pari a 30 μ M BzATP (**Figura 21**).

Questi dati mettono in evidenza come i cheratinociti umani, non solo esprimano l'mRNA per diversi sottotipi P2, ma che tali recettori risultino essere funzionali in quanto la stimolazione con nucleotidi extracellulari determina variazioni nella concentrazione di calcio citoplasmatico.

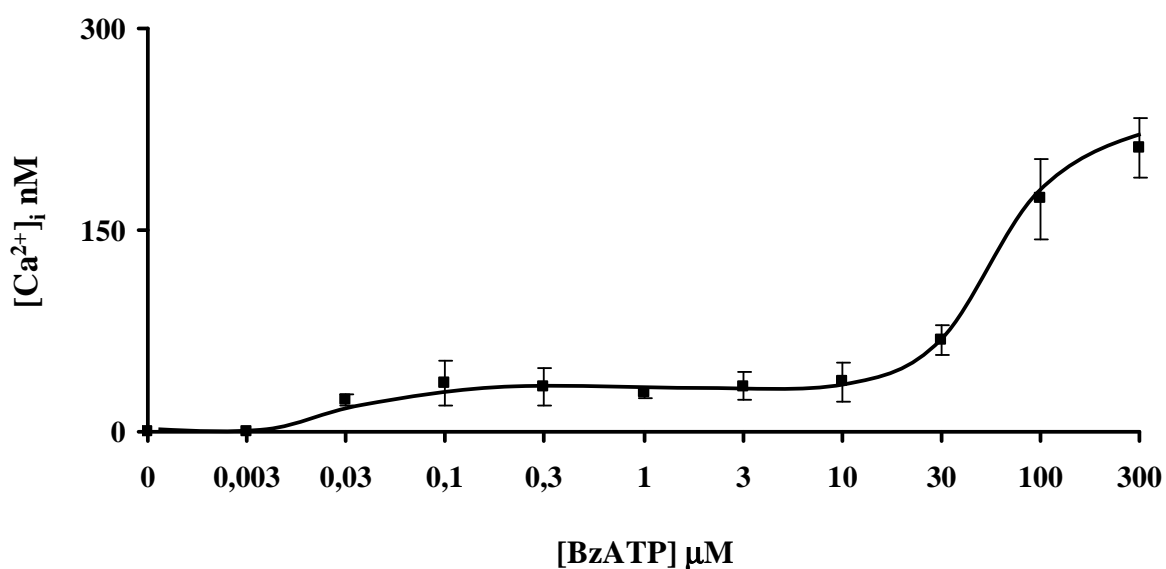


Figura 21) Curva dose-dipendenza del BzATP. I cheratinociti sono stati caricati con l'indicatore fluorescente fura-2/AM e mantenuti in una soluzione salina contenente 1 mM CaCl₂, come indicato nei Metodi. La curva è indicativa di almeno tre esperimenti indipendenti e le barre d'errore rappresentano le deviazioni standard.

La stimolazione con nucleoidi extracellulari determina modificazioni morfologiche dei cheratinociti

I cheratinociti umani esprimono recettori P2 attivabili da parte dei nucleotidi extracellulari. Si è visto come questi siano in grado di determinare variazioni nella concentrazione citosolica del calcio; mi sono quindi chiesta se la stimolazione con i nucleotidi fosse anche in grado di determinare modificazioni a livello della morfologia cellulare. Ho perciò stimolato i cheratinociti con nucleotidi extracellulari osservando al microscopio a contrasto di fase, gli eventi che seguivano alla stimolazione.

La stimolazione dei cheratinociti con diverse concentrazioni di ATP (300 μ M, 1 mM, 3 mM) induce riduzione del volume cellulare con formazione, nel caso di alcune cellule, di vescicole (“blebs”) di membrana (**Figura 22**).

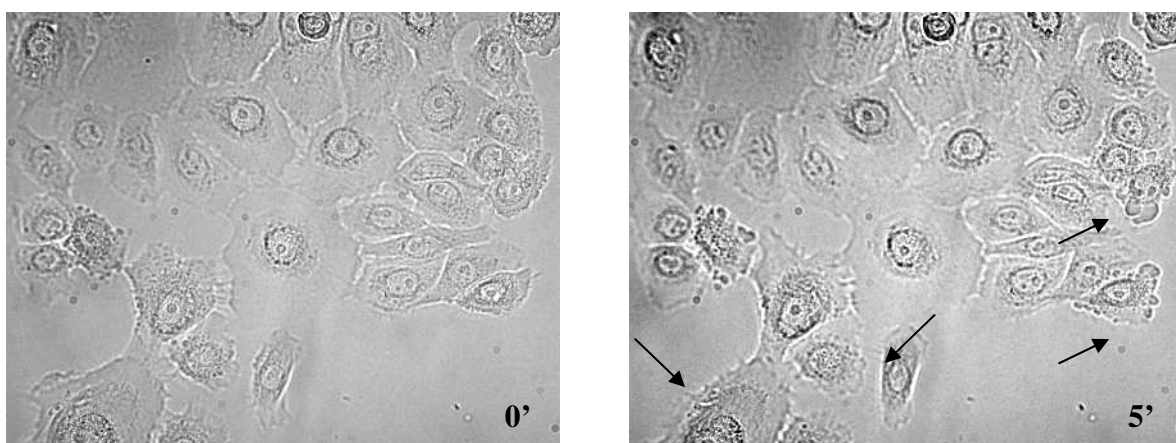


Figura 22) La stimolazione dei cheratinociti con 3 mM ATP determina restrizione del volume cellulare e formazione di vescicole di membrana. I cheratinociti umani sono stati trattati con 3 mM ATP in salina standard in presenza di 1 mM Ca^{2+} . Già dopo 5 minuti dalla stimolazione si osserva la formazione di blebs a livello della membrana plasmatica e una diminuzione del volume cellulare.

Poichè lo ione calcio è un importante secondo messaggero coinvolto in molti processi biologici mi sono chiesta se fosse importante anche per questo processo.

I cheratinociti sono stati stimolati in soluzione salina in assenza di Ca^{2+} extracellulare e in presenza di un chelante dello ione (0.5 mM EGTA) per sequestrare il Ca^{2+} contaminante, eventualmente presente nella soluzione in cui è stato condotto l'esperimento.

In queste condizioni la stimolazione con 3 mM ATP porta ad una riduzione più consistente del volume cellulare, le cellule presentano inoltre grosse vescicole di membrana (**Figura 23**).

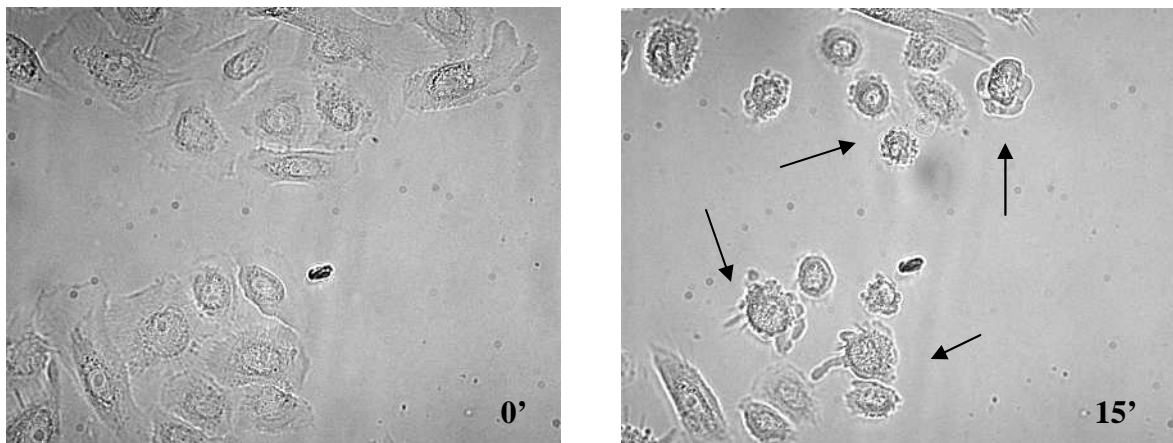


Figura 23) *La stimolazione con ATP, in assenza di calcio extracellulare, determina riduzione del volume cellulare e formazione di grosse blebs di membrana. I cheratinociti sono stati trattati con 3 mM ATP in salina standard in presenza di 0.5 mM EGTA. Dopo 15 minuti dalla stimolazione si osserva la formazione di grosse blebs a livello della membrana plasmatica e una diminuzione del volume cellulare.*

Oltre all'ATP sono stati utilizzati altri nucleotidi come l'UTP e il BzATP; in questo caso si è osservato come tali nucleotidi siano in grado di determinare lievi modificazioni morfologiche che consistono in un restringimento cellulare.

IL-4 e IFN- γ modulano l'espressione dei messaggeri dei sottotipi P2Y₁ e P2X₇

I cheratinociti giocano un ruolo importante nell'indurre e nel perpetuare le reazioni infiammatorie della pelle attraverso il rilascio di citochine e la risposta ad esse.

La produzione di citochine da parte dei cheratinociti ha molteplici conseguenze sia per la migrazione delle cellule, sia a livello del sistema immunitario (in quanto viene influenzata così la proliferazione e il processo di differenziazione nei cheratinociti), sia sulla produzione di altre citochine da parte degli stessi.

Al fine di valutare se la stimolazione con citochine, importanti in malattie della pelle quali psoriasi e dermatite atopica, fosse in grado di modulare anche le risposte P2-mediate, ho stimolato i cheratinociti con IL-4 e IFN- γ (Roland, 2003).

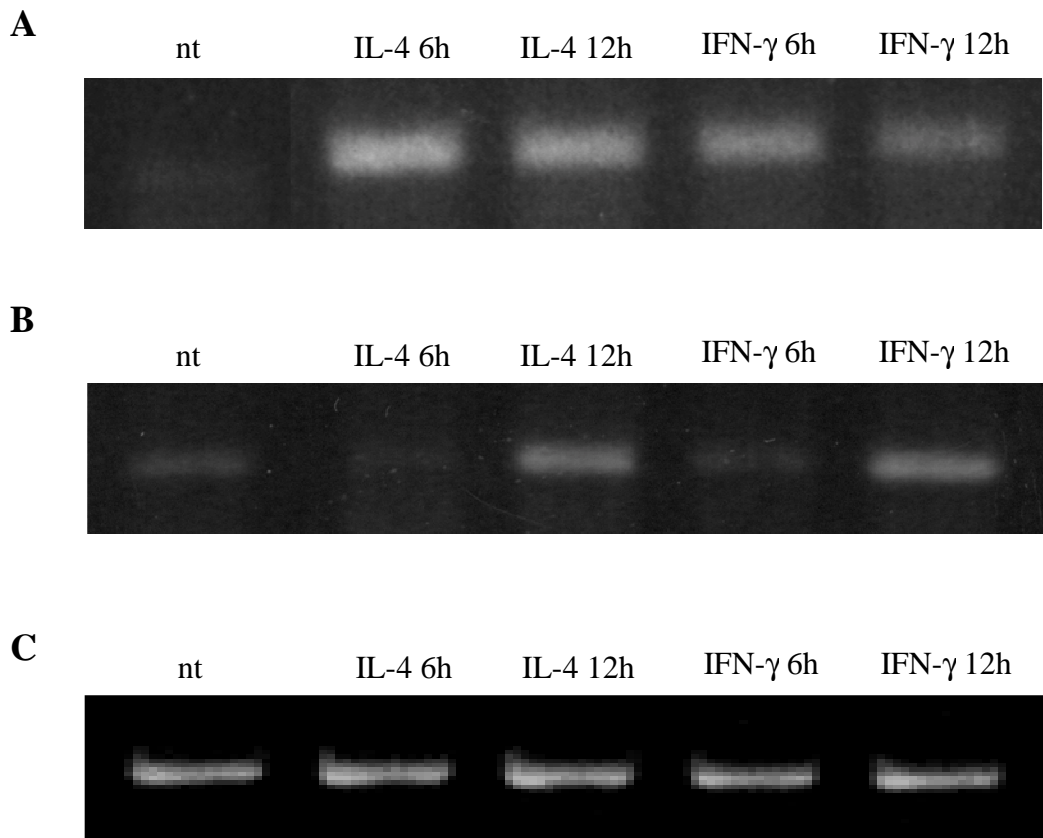


Figura 24) Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di RT-PCR del recettore P2Y₁ (pannello A), P2X₇ (pannello B) e dell'actina (pannello C). Le reazioni di RT-PCR sono state effettuate come descritto nei Metodi.

L'analisi attraverso RT-PCR ha messo in evidenza come queste citochine siano in grado di modulare l'espressione dei messaggeri per i sottotipi P2Y₁ e P2X₇ (**Figura 24**).

Per quanto riguarda il recettore P2Y₁ si osserva una over-espressione già dopo sei ore dal trattamento con IL-4 o IFN- γ , mentre per il recettore P2X₇ bisogna trattare i cheratinociti per 12 ore per poter osservare un aumento nell'espressione dell'mRNA di tale recettore.

Questo aumento nell'espressione dell'mRNA non si osserva nel caso di altri recettori P2 come ad esempio P2Y₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅ (**Figura 25**).

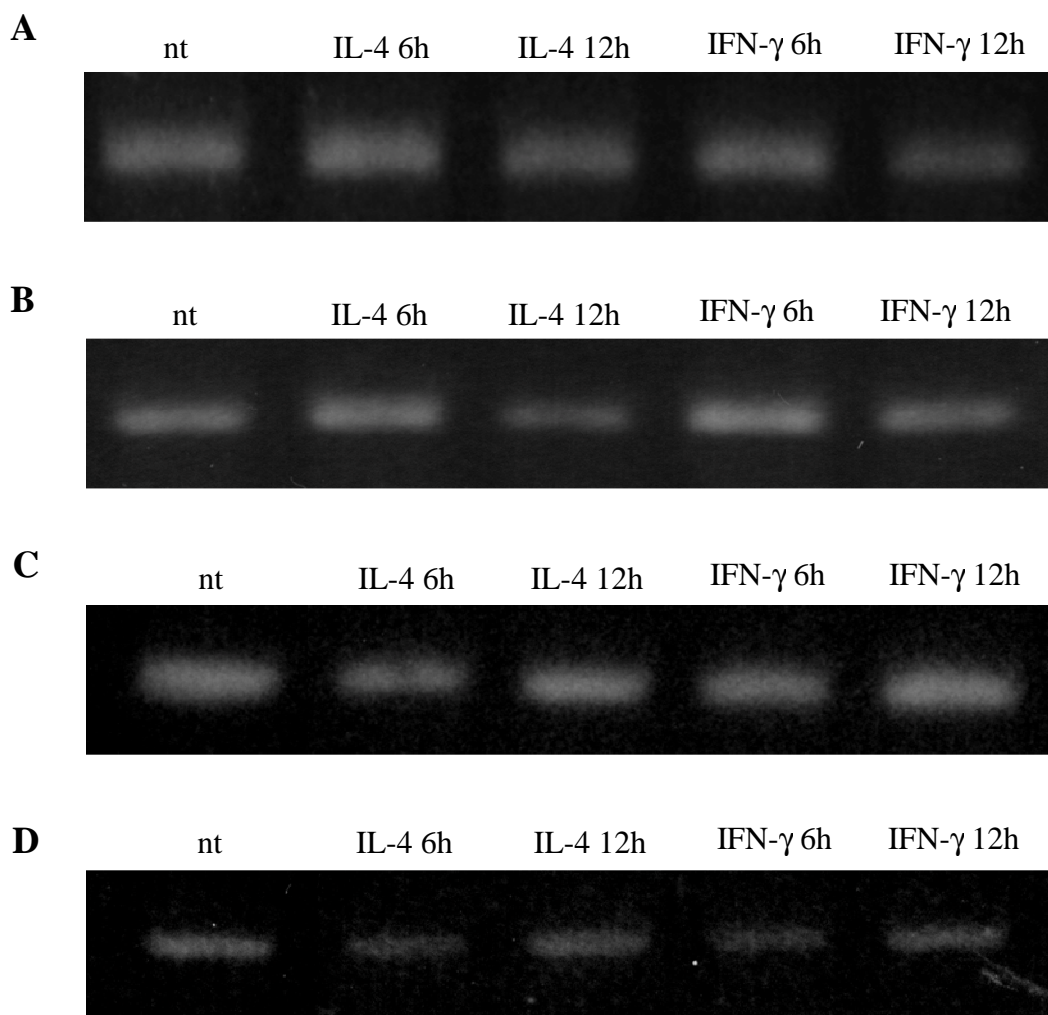


Figura 25) Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di RT-PCR del recettore P2Y₂ (pannello A), P2X₃ (pannello B), P2X₄ (pannello C), P2X₅ (pannello D). Le reazioni di RT-PCR sono state effettuate come descritto nei Metodi.

L'analisi tramite Western blot ha successivamente messo in evidenza come, per i sottotipi recettoriali P2Y₁ e P2X₇, l'aumento nell'espressione dei messaggeri non si traduca poi in un aumento dell'espressione della proteina (**Figura 26**).

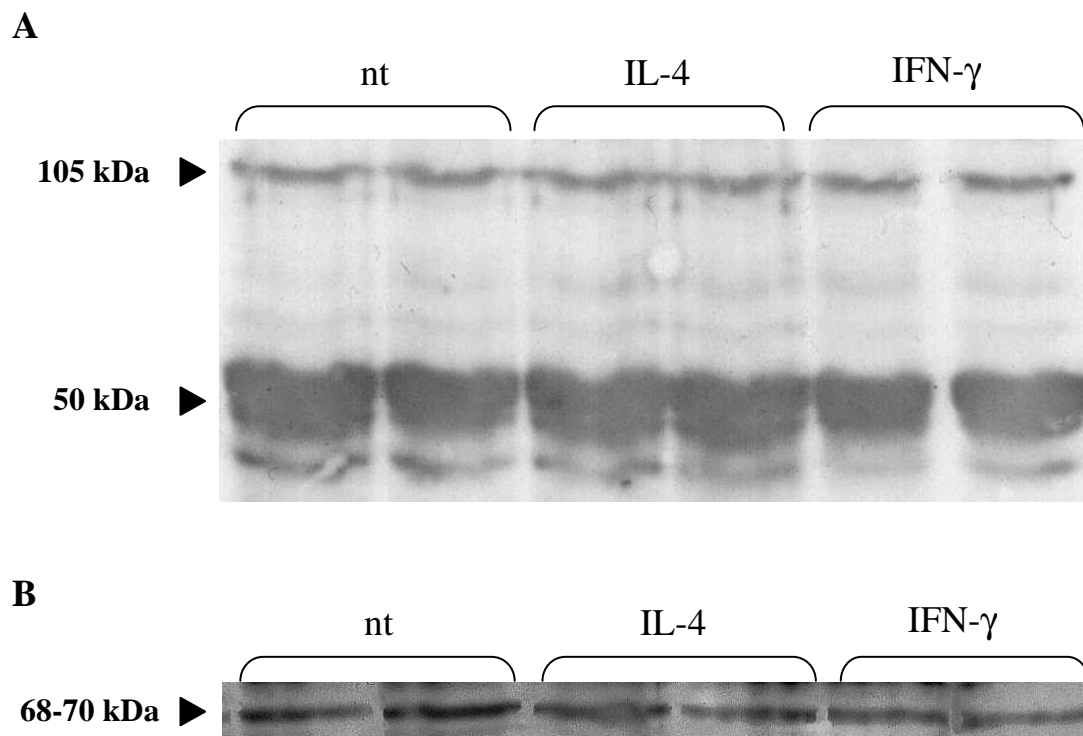


Figura 26) La stimolazione con IL-4 o IFN- γ non determina un aumento rilevabile nell'espressione della proteina dei recettori P2Y₁ (pannello A) e P2X₇ (pannello B). I cheratinociti umani sono stati trattati con IL-4 o IFN- γ per 14 ore.

Le risposte dei recettori P2 non sono modulate dal trattamento con IL-4 e IFN- γ

La stimolazione dei cheratinociti con nucleotidi extracellulari è stata condotta anche in seguito al pre trattamento di queste cellule con citochine quali IL-4 o IFN- γ , importanti in alcune patologie della cute, al fine di valutare se queste fossero in grado di modulare le risposte funzionali dei recettori P2.

La **Figura 27** mostra come la stimolazione con 1 mM ATP, in cheratinociti umani, induca un rapido e sostenuto aumento della concentrazione di calcio citosolico.

Nel caso in cui vengano stimolati con 1 mM ATP, cheratinociti pre-trattati per 14 ore con IL-4, si osserva una risposta calcio simile sia per andamento, che per intensità, a quella indotta nelle cellule non trattate con la citochina.

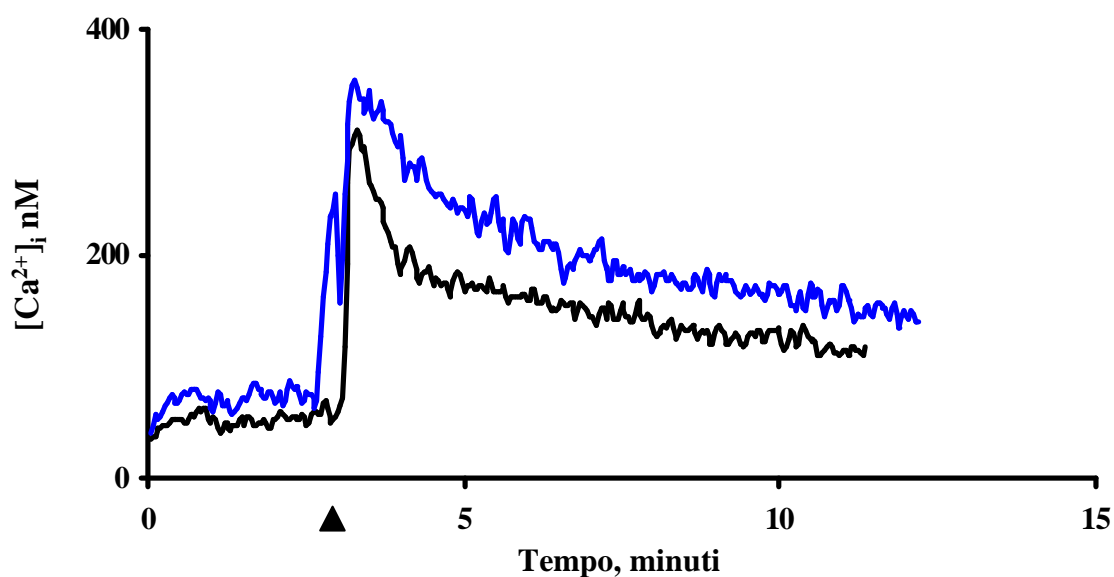


Figura 27) Risposta calcio indotta dalla stimolazione con 1 mM ATP in cheratinociti umani di controllo (linea nera) e in cheratinociti pre trattati con la citochina IL-4 (linea blu). I cheratinociti umani vengono caricati con l'indicatore fluorescente fura-2/AM e mantenuti in una soluzione salina contenente 1 mM Ca²⁺ come indicato nei Metodi.

I cheratinociti sono stati anche pre-trattati per 14 ore con IFN- γ e poi stimolati con 1 mM ATP; anche in questo caso si osserva come la risposta calcio sia caratterizzata da una curva con andamento paragonabile a quella riscontrata nei cheratinociti di controllo (**Figura 28**). Le due citochine, quindi, non sono in grado di modulare le risposte calcio indotte dalla stimolazione con ATP.

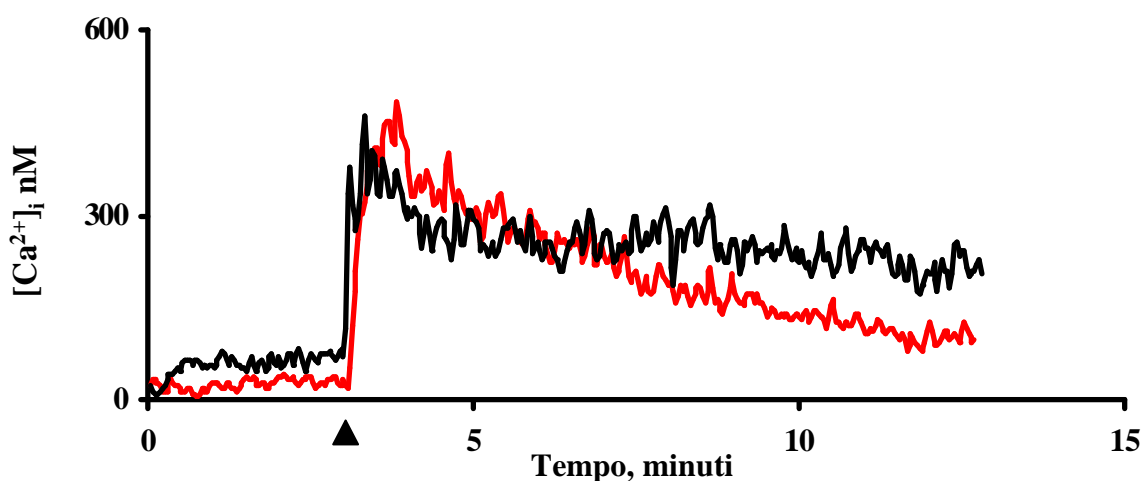


Figura 28) Risposta calcio indotta dalla stimolazione con 1 mM ATP in cheratinociti umani di controllo (linea nera) e pre-trattati con IFN- γ (linea rossa). I cheratinociti umani vengono caricati con l'indicatore fluorescente fura-2/AM e mantenuti in una soluzione salina contenente 1 mM Ca^{2+} come indicato nei Metodi.

Dall'analisi tramite RT-PCR è emerso come IL-4 e IFN- γ siano in grado di modulare l'espressione del messaggero di P2X₇, mi sono quindi chiesta se questa modulazione si traducesse in un'augmentata risposta calcio. A tal fine ho utilizzato il BzATP, il miglior agonista conosciuto per tale recettore.

Come mostrato in **Figura 29** (pannello A) i cheratinociti, in seguito al trattamento con 300 μ M BzATP, mostrano una risposta caratterizzata da una prima fase veloce seguita da una fase più lenta e sostenuta; così come le cellule pre-trattate per 14 ore con IL-4.

Successivamente i cheratinociti sono stati pre-trattati per 14 ore con la citochina IFN- γ e poi stimolati con 100 μ M BzATP; anche in questo caso si osserva come la risposta calcio sia caratterizzata da una curva con andamento paragonabile sia per intensità che per andamento a quella riscontrata nei cheratinociti di controllo (**Figura 29**, pannello B).

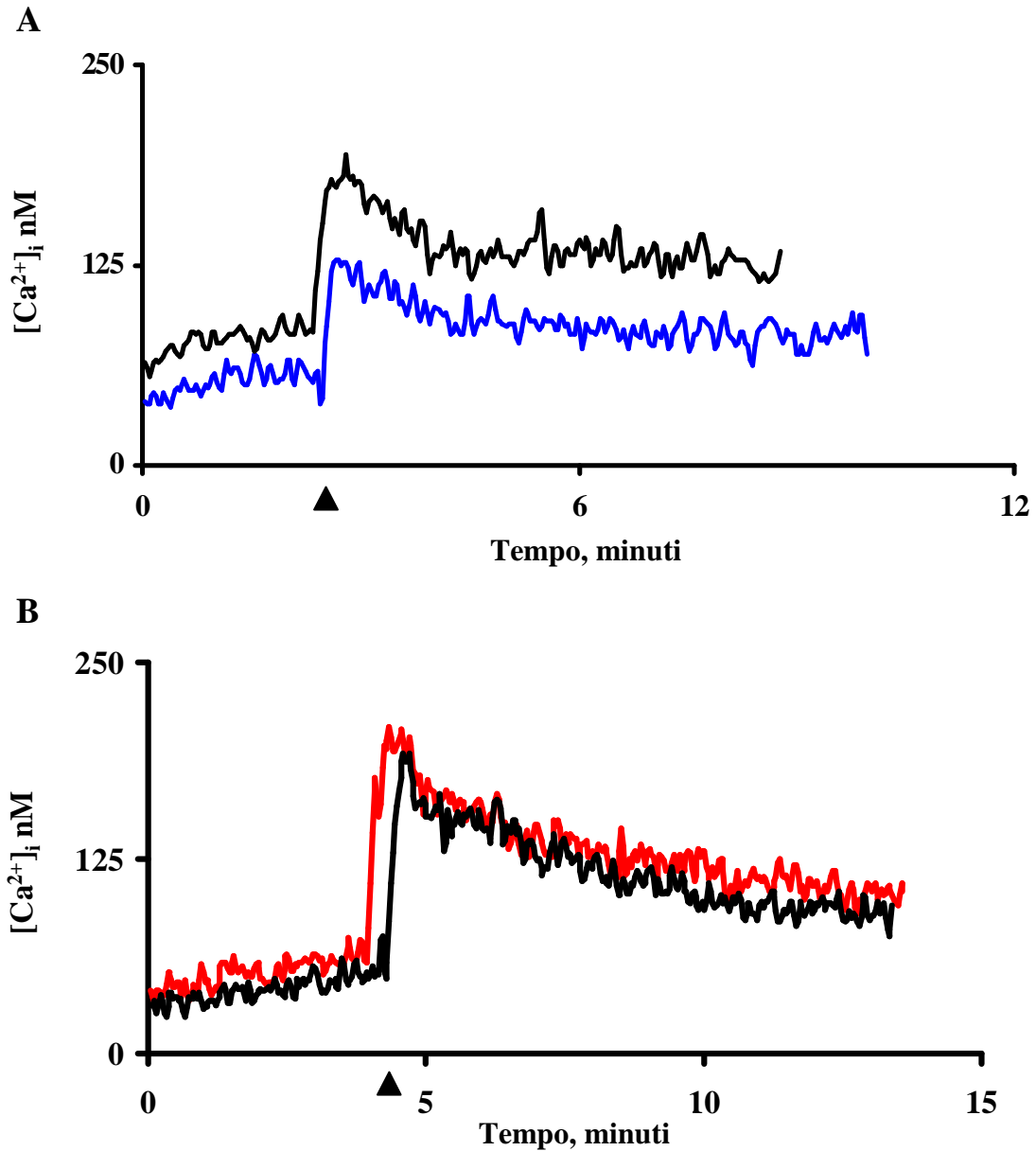
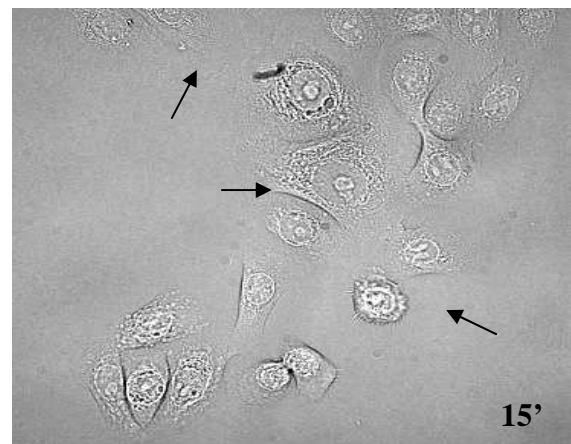
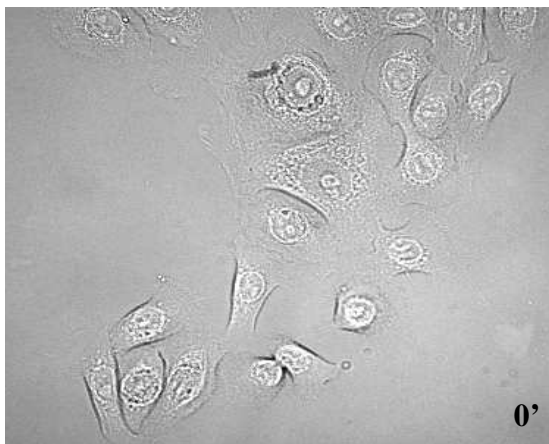


Figura 29) Risposta calcio indotta dalla stimolazione con 100 μ M BzATP di cheratinociti umani. Pannello A: cheratinociti di controllo (linea nera) e cheratinociti pre-trattati con la citochina IL-4 (linea blu); pannello B: cheratinociti di controllo (linea nera) e cheratinociti pre-trattati con la citochina IFN- γ (linea rossa).

Il pretrattamento dei cheratinociti con IL-4 o IFN- γ non determina modificazioni significative a livello della morfologia cellulare

Poiché è emerso il ruolo fondamentale di queste citochine in molte patologie legate alla cute e poichè esse sono in grado di determinare modificazione nell'espressione dei messaggeri di alcuni sottotipi P2, sono andata ad indagare l'eventuale capacità dell'IL-4 e dell'IFN- γ di mediare modificazioni a livello della morfologia cellulare.

A



B

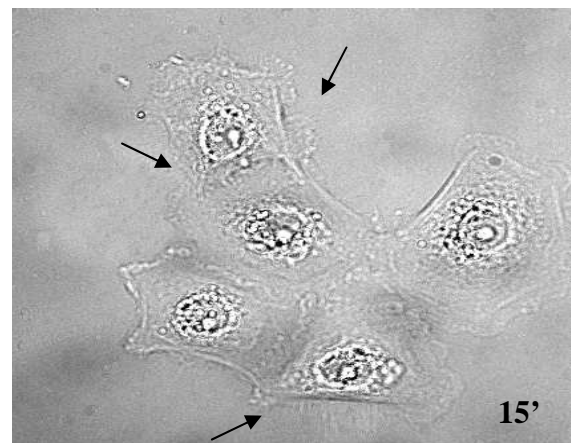
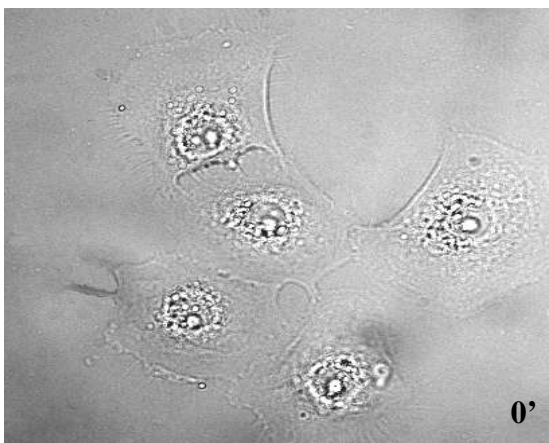


Figura 30) Il pre-trattamento con IL-4 o IFN- γ determina riduzione del volume cellulare. I cheratinociti umani sono stati trattati con 3 mM ATP in salina standard in presenza di 1 mM Ca^{2+} . Dopo 15 minuti dalla stimolazione si osserva la formazione di piccole blebs a livello della membrana plasmatica e una diminuzione del volume cellulare. Pannello A: cheratinociti pre-trattati per 14 ore con IL-4; pannello B: cheratinociti umani pre-trattati per 14 ore con IFN- γ .

Ho stimolato, quindi, i cheratinociti con 3 mM ATP in una soluzione salina contenente calcio extracellulare (**Figura 30**) e in una salina standard priva di calcio e addizionata di 0.5 mM EGTA (non mostrati). In entrambe queste condizioni si assiste a una riduzione del volume cellulare paragonabile a quella osservata nei cheratinociti di controllo, cioè non trattati con le citochine, ad indicare ancora una volta come l'aumento dell'espressione dei messaggeri non si traduca poi in un aumento delle funzionalità.

Anche in seguito al trattamento con UTP e BzATP si osservano modificazioni morfologiche di entità simile a quelle osservate in seguito a stimolazione dei cheratinociti non trattati con le citochine (non mostrati).

PARTE SECONDA

Macrofagi

La stimolazione con nucleotidi extracellulari determina modificazioni morfologiche nei macrofagi

I macrofagi umani esprimono recettori P2, attivati dai nucleotidi extracellulari. Non è nota la funzione di questi recettori, che potrebbero contribuire all'attivazione dei macrofagi e a renderli maggiormente in grado di rispondere ai microrganismi.

Ho perciò stimolato i macrofagi, derivanti da monociti ottenuti da sangue periferico, con nucleotidi extracellulari osservando al microscopio a contrasto di fase gli eventi che seguivano alla stimolazione.

La stimolazione dei macrofagi con diverse concentrazioni di ATP (300 μ M, 1 mM, 3 mM) induce retrazione dei prolungaenti cellulari (filipodi) e riduzione del volume cellulare con formazione e rilascio di microvescicole nell'ambiente extracellulare (**Figura 31**, pannello A).

I macrofagi esprimono elevati livelli del recettore P2X₇ (Hickman et al., 1994; Falzoni et al., 1995) che è coinvolto nel rilascio di IL-1, ossido nitrico, nella morte cellulare e recentemente è emerso essere responsabile del rilascio di microvescicole da cellule HEK293, monociti THP-1 e microglia (MacKenzie et al., 2001). Per verificare se P2X₇ sia responsabile delle risposte indotte da ATP nei macrofagi, ho utilizzato l'agonista di P2X₇, il BzATP, un analogo farmacologico dell'ATP. I macrofagi sono stati stimolati con 200 μ M BzATP per 10 minuti, durante i quali si è osservata una diminuzione del volume cellulare, formazione di vescicole di membrana ed emissione di vescicole nell'ambiente extracellulare (**Figura 31**, pannello B). L'emissione di microvescicole è stata osservata anche in seguito alla stimolazione con concentrazioni inferiori di BzATP (30 μ M, 100 μ M), evidenziando come questo agonista sia estremamente efficace sui macrofagi.

Nella maggior parte degli esperimenti che seguono è stata utilizzata la concentrazione più alta di BzATP (200 μ M), per assicurare una buona resa del rilascio di microvescicole.

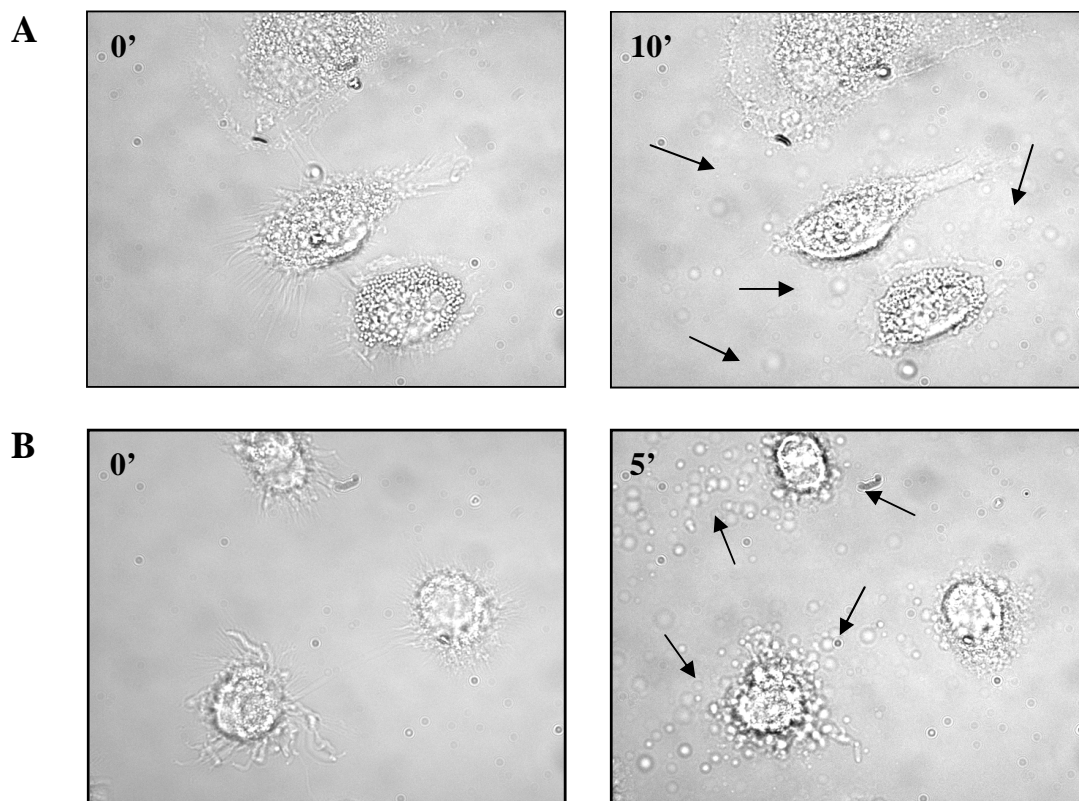
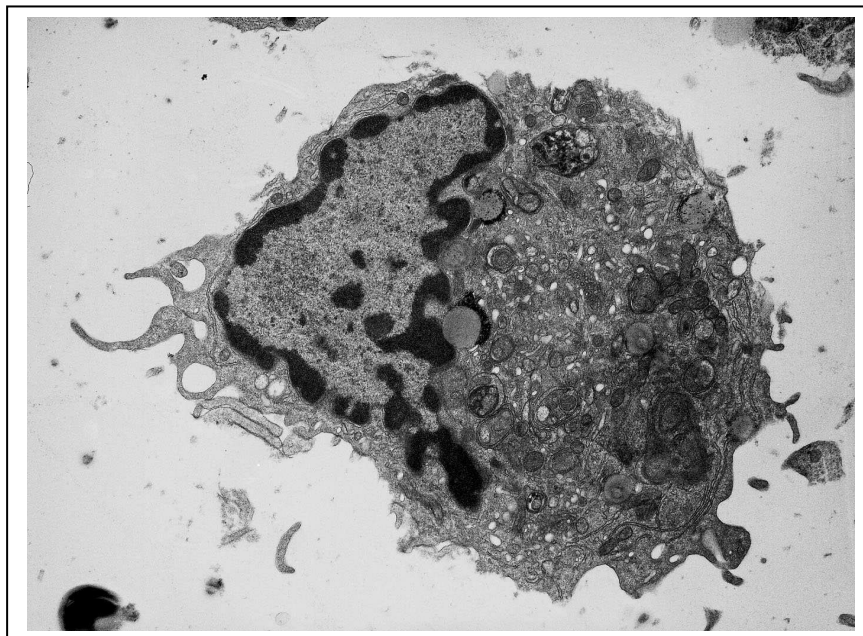


Figura 31) La stimolazione con ATP (pannello A) o con BzATP (pannello B) determina il rilascio di microvescicole da parte dei macrofagi. Pannello A: Macrofagi umani sono stati trattati con 3 mM ATP in salina saccarosio in presenza di 1 mM Ca^{2+} . Dopo 10 minuti si ha un rilascio massiccio di vescicole, anche se il fenomeno è visibile già a 2 minuti dalla stimolazione. Pannello B: Immagine di macrofagi umani stimolati con 200 μ M BzATP in salina saccarosio in presenza di 1 mM Ca^{2+} . Le immagini sono rappresentative di quelle ottenute in tre esperimenti indipendenti nei quali sono stati stimolati macrofagi ottenuti da tre diversi donatori. Sono stati analizzati dieci campi per esperimento.

I macrofagi trattati con i diversi nucleotidi rilasciano, attraverso le microvescicole, una quantità variabile ma quantificabile di proteina: 7.9 ± 0.5 μ g di proteina/ 1×10^6 cellule in seguito al trattamento con 200 μ M BzATP; 6.6 ± 0.7 μ g di proteina/ 1×10^6 cellule con 1 mM ATP ed infine 4.1 ± 0.8 μ g di proteina/ 1×10^6 cellule con 3 mM ATP. I dati rappresentano la media del rilascio ottenuto da cellule di 16 donatori diversi.

L'analisi al microscopio elettronico mostra come la stimolazione del recettore P2X₇ con BzATP, induca drammatiche modificazioni sia a livello intracellulare (grossi vacuoli intracitoplasmatici) che a livello della membrana (**Figura 32**).

A



B

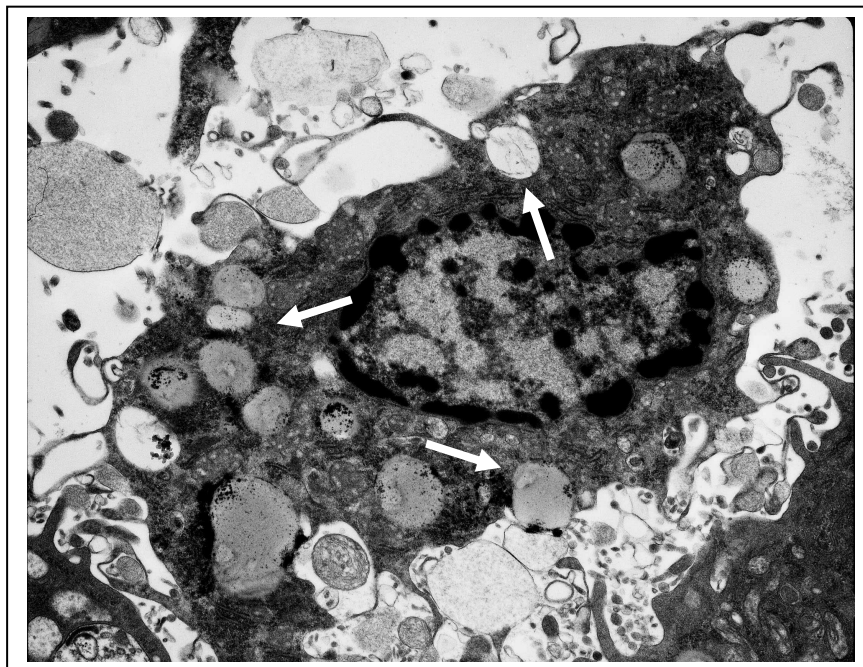


Figura 32) La stimolazione con BzATP determina un grosso cambiamento nella morfologia della membrana plasmatica. I macrofagi sono stati trattati per 2 ore con LPS (pannello A) e successivamente per 10 minuti con 200 μ M BzATP (pannello B).

Importanza del calcio nel rilascio delle microvescicole

È noto in letteratura come lo ione calcio sia un importante secondo messaggero coinvolto in molti processi biologici come la coagulazione del sangue, la contrazione muscolare, la morte cellulare e l'esocitosi.

Per verificare se la presenza del calcio sia importante anche nel processo di vescicolazione, i macrofagi sono stati stimolati con i diversi nucleotidi in salina saccarosio in assenza di Ca^{2+} extracellulare e in presenza di un chelante dello ione (0.5 mM EGTA) per sequestrare il Ca^{2+} contaminante, eventualmente presente nella soluzione in cui è stato condotto l'esperimento.

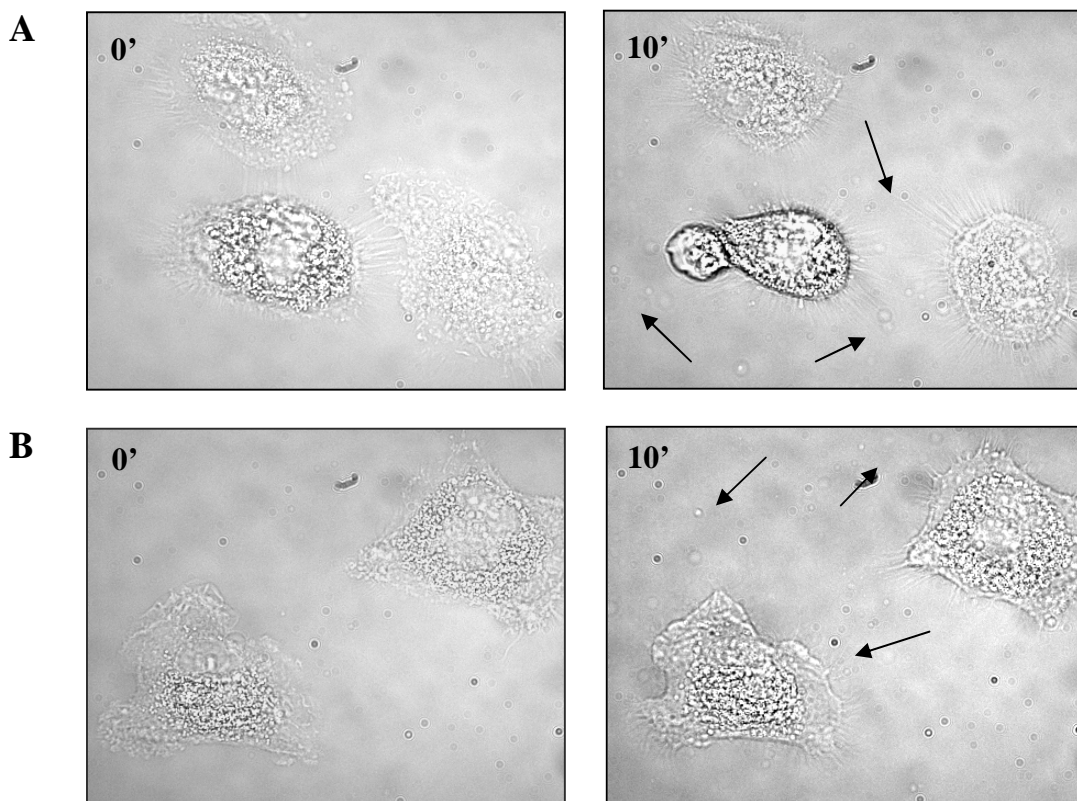


Figura 33) La stimolazione con ATP (pannello A) e con BzATP (pannello B), in assenza di calcio extracellulare, riduce notevolmente il rilascio di microvescicole dai macrofagi. I macrofagi sono stati trattati con 3 mM ATP (pannello A) o con 200 μM BzATP (pannello B) in salina saccarosio in presenza 0.5 mM EGTA. Dopo 10 minuti dalla stimolazione si osserva una riduzione del volume cellulare accompagnata da uno scarso rilascio di microvescicole.

È emerso come in queste condizioni vi sia scarso rilascio di microvescicole sia a seguito del trattamento con BzATP che con ATP, suggerendo come il Ca^{2+} svolga un ruolo importante anche nel processo di vescicolazione (**Figura 33**).

La quantificazione delle microvescicole rilasciate in assenza di calcio extracellulare ha messo in evidenza una riduzione di circa il 66% del rilascio (**Figura 34**).

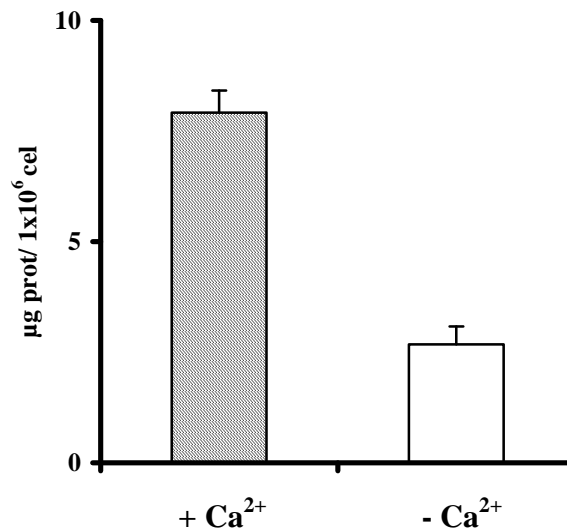


Figura 34) Il Ca^{2+} extracellulare è importante per il rilascio delle microvescicole. I macrofagi umani sono stati pretrattati per 2 ore con 3 µg/ml LPS e stimolati per 10 minuti con 200 µM BzATP in assenza di Ca^{2+} extracellulare.

Il rilascio delle microvescicole avviene anche in salina standard contenente calcio

Tutti gli esperimenti fino ad ora descritti sono stati condotti in una soluzione salina in cui lo ione Na^+ veniva sostituito con il saccarosio in quanto quest'ultimo "stabilizza" le vescicole rendendole più facilmente recuperabili. Al fine di verificare se il rilascio di microvescicole indotto dai nucleotidi avvenga anche in condizioni più vicine a quelle del mezzo extracellulare, ho stimolato i macrofagi in salina contenente Na^+ (vedi Metodi) in presenza di calcio extracellulare. In tali condizioni si sono osservate le stesse modificazioni morfologiche viste in salina saccarosio evidenziando come la presenza di saccarosio e l'assenza di Na^+ non alterino il processo (non mostrato). Se invece la stimolazione dei

macrofagi avviene in salina Na^+ priva di calcio extracellulare si osserva dapprima il rilascio di microvescicole (nei primi 5 minuti) poi la formazione di grosse “blebs”, evaginazioni di membrana, in tempi più lunghi (dopo 15 minuti) (non mostrato).

Il rilascio di microvescicole è P2X_7 -dipendente

I macrofagi esprimono anche recettori della sottofamiglia P2Y , che vengono attivati da agonisti quali ADP e UTP oltre che da ATP. Per verificare se l'emissione di microvescicole sia dovuta anche alla stimolazione di questo sottotipo, ho utilizzato l'agonista P2Y : UTP.

I macrofagi sono stati stimolati con UTP per gli stessi tempi e alla stessa concentrazione dell'ATP, ma in seguito a tale trattamento non è stata osservata nessuna modificazione morfologica e nemmeno rilascio di microvescicole (**Figura 35**).

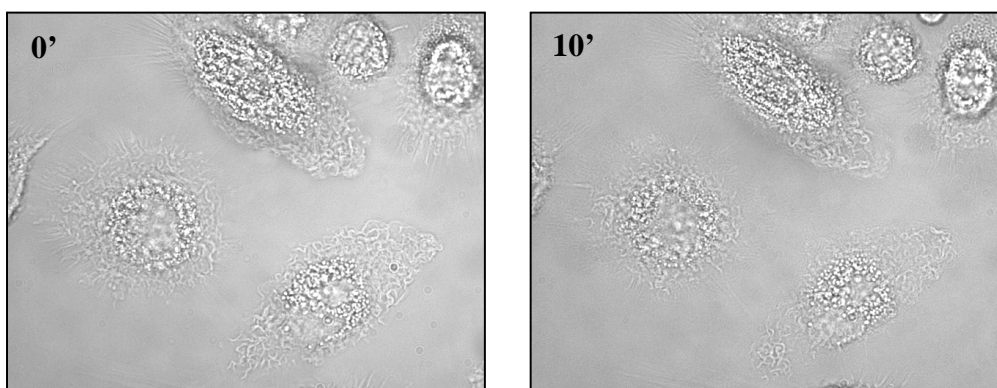


Figura 35) La stimolazione con UTP non determina il rilascio di microvescicole dai macrofagi. Le cellule sono state trattate con 1 mM UTP in salina saccarosio in presenza di 1 mM Ca^{2+} .

Esclusa la partecipazione dei recettori P2Y , attivati dall'UTP, nel processo di microvescicolazione, ho cercato di confermare il coinvolgimento del sottotipo P2X . Per verificare se il rilascio di microvescicole fosse P2X_7 -dipendente, i macrofagi sono stati trattati con oATP, un inibitore irreversibile del recettori P2X_7 .

E' noto come il rilascio di microvescicole sia dipendente dall'attivazione del recettore P2X₇ (MacKenzie et al., 2001; Bianco et al., 2005); anche il rilascio osservato nei macrofagi viene inibito se la stimolazione con BzATP o ATP è preceduta dall'incubazione delle cellule con ATP ossidato (oATP) (**Figura 36**).

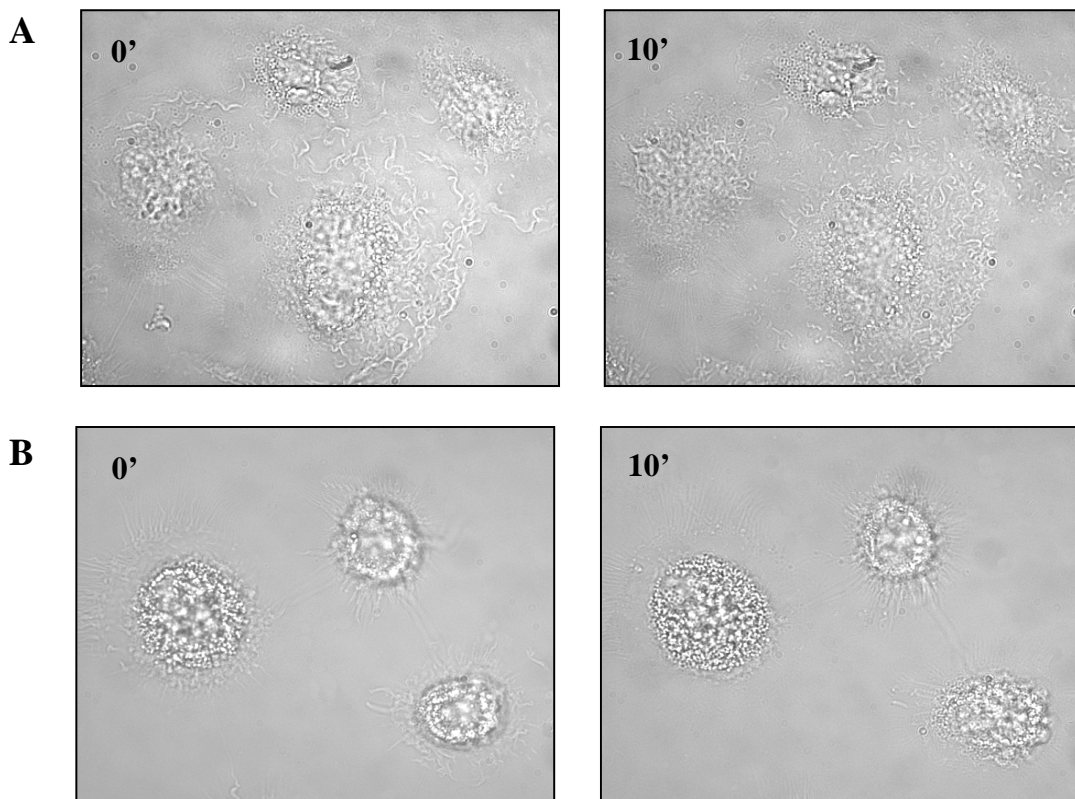


Figura 36) Il trattamento con 600 μM oATP inibisce il rilascio di microvescicole indotto da 3 mM ATP (pannello A) o da 200 μM BzATP (pannello B). Le cellule sono state trattate con ATP o BzATP in salina saccarosio in presenza di 1 mM Ca²⁺, dopo preincubazione per 2h con 600 μM oATP.

Le microvescicole contengono la citochina proinfiammatoria IL-18

E' noto dalla letteratura come le microvescicole siano vettori di scambio dell'informazione biologica tra cellule, contenendo o esponendo sulla superficie molecole quali: fosfatidilserina, aminofosfolipidi, fattore tissutale e citochine come l'IL-1β. L'emissione di microvescicole potrebbe rappresentare un sistema per il rilascio di proteine

citoplasmatiche che non hanno sequenze *leader* per la secrezione, come IL-1 β e IL-18 (MacKenzie et al., 2001). Queste citochine proinfiammatorie sono prodotte anche dai macrofagi e vengono attivate proteolicamente dallo stesso enzima: la caspasi-1 (ICE).

A tal proposito ho indagato il contenuto di IL-18 nelle microvescicole rilasciate dai macrofagi, in seguito alla stimolazione con BzATP, dopo rottura delle stesse tramite cicli di congelamento/scongelo. Da questa analisi è emerso come le microvescicole contengano IL-18 ad una concentrazione pari a 0.7 ± 0.06 pg IL-18/ 1×10^6 cellule (**Figura 37**).

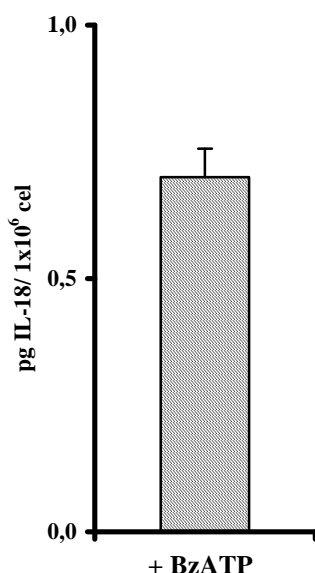
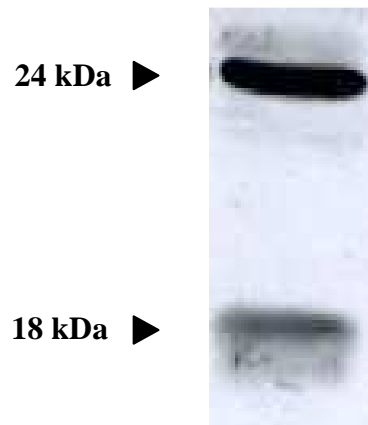


Figura 37) La stimolazione dei macrofagi con BzATP induce il rilascio di microvescicole contenenti IL-18. I macrofagi umani sono stati pretrattati per 2 ore con 3 μ g/ml LPS e stimolati per 10 minuti con 200 μ M BzATP; i surnatanti sono stati raccolti e ultracentrifugati. Il contenuto di IL-18 delle microvescicole è stato misurato mediante ELISA.

E' noto dalla letteratura che l'IL-18 viene sintetizzata come precursore biologicamente inattivo (pro-IL-18) avente peso molecolare di 24 kDa. Il taglio proteolitico viene effettuato a livello del residuo aminoacidico Asp-36, da una serin proteasi intracellulare detta ICE determinando la trasformazione/conversione della citochina nella forma matura di peso molecolare di 18 kDa (Gu et al., 1997).

Ho quindi verificato se nelle vescicole fossero presenti entrambe le forme della citochina, osservando come in seguito alla stimolazione con ATP o BzATP (**Figura 38**) vengano rilasciate microvescicole che contengono sia la forma di 24 kDa che quella da 18 kDa della citochina.



***Figura 38)** Le microvescicole rilasciate dai macrofagi contengono entrambe le forme di IL-18. I macrofagi sono stati trattati con 3 µg/ml LPS e 200 µM BzATP in soluzione salina saccarosio. Dall'analisi tramite Western blot è possibile osservare come le vescicole contengano sia la forma matura che immatura della citochina.*

Poiché si ritiene che il taglio della citochina avvenga al momento della secrezione, mi sono chiesta se il rilascio delle microvescicole fosse dipendente dall'attivazione della caspasi-1. Il rilascio delle microvescicole non è dipendente, almeno in parte, dall'attività di ICE (8.8 ± 0.8 µg proteina/ 1×10^6 cellule), in quanto l'incubazione con Y-VAD, un inibitore specifico della caspasi-1, induce una riduzione nel rilascio di microvescicole pari a circa il 30% (**Figura 38**, pannello A). Successivamente sono andata ad indagare la presenza di IL-18 all'interno delle stesse, al fine di valutare se il pretrattamento con l'inibitore, prima della stimolazione e della purificazione delle microvescicole, bloccasse la maturazione della citochina (**Figura 39**, pannello B). In queste condizioni si osserva come sia le vescicole rilasciate da macrofagi protrattati con YVAD, che quelle provenienti da

macrofagi di controllo, presentino entrambe le forme di IL-18 (18 kDa e 24 kDa), indicando come i processi di accumulo e maturazione della citochina nelle microvescicole siano indipendenti dall'attività della caspasi-1.

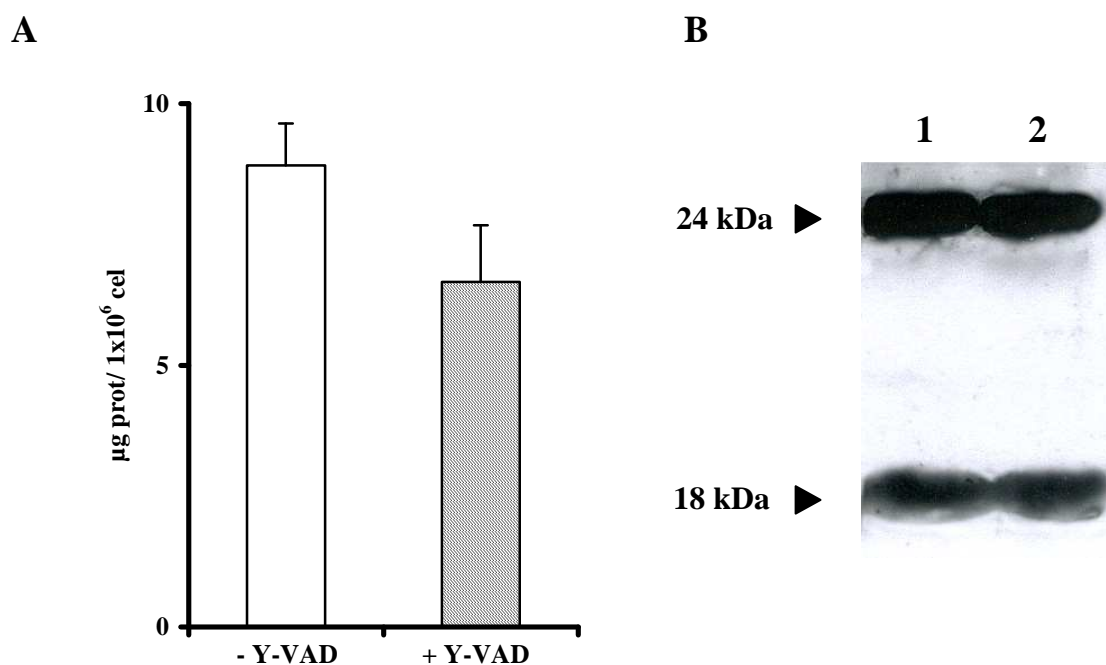


Figura 39) L'attivazione della caspasi-1 non è necessaria per il rilascio delle microvescicole (pannello A) nè per la maturazione di IL-18 (pannello B). I macrofagi sono stati pretrattati "overnight" con 100 µM Y-VAD, incubati per 2 ore con 3 µg/ml LPS ed infine stimolati per 10 minuti con 200 µM BzATP in soluzione salina saccarosio. Pannello A: il pretrattamento con l'inibitore della caspasi-1 riduce il rilascio di microvescicole di circa il 30%. Pannello B: dall'analisi tramite Western blot è stato possibile osservare come le vescicole contengano sia la forma matura che immatura della citochina, indicando che accumulo e maturazione della citochina avvengono mediante un meccanismo indipendente dalla caspasi. **1.** campione trattato con Y-VAD; **2.** campione non trattato con Y-VAD. Le proteine sono state analizzate su gel al 12% acrilamide.

Ho poi studiato il coinvolgimento del potassio extracellulare nel processo di microvescicolazione esaminando il rilascio di microvescicole in una soluzione ad elevato contenuto di potassio. Tale ione infatti si è visto essere importante per l'attivazione della

caspasi-1 ma anche nel rilascio di IL-1 β dipendente dall'attivazione del recettore P2X₇ (Perreaux e Gabel., 1994; Sanz e Di Virgilio 2000; Kahlenberg e Dubyak, 2004).

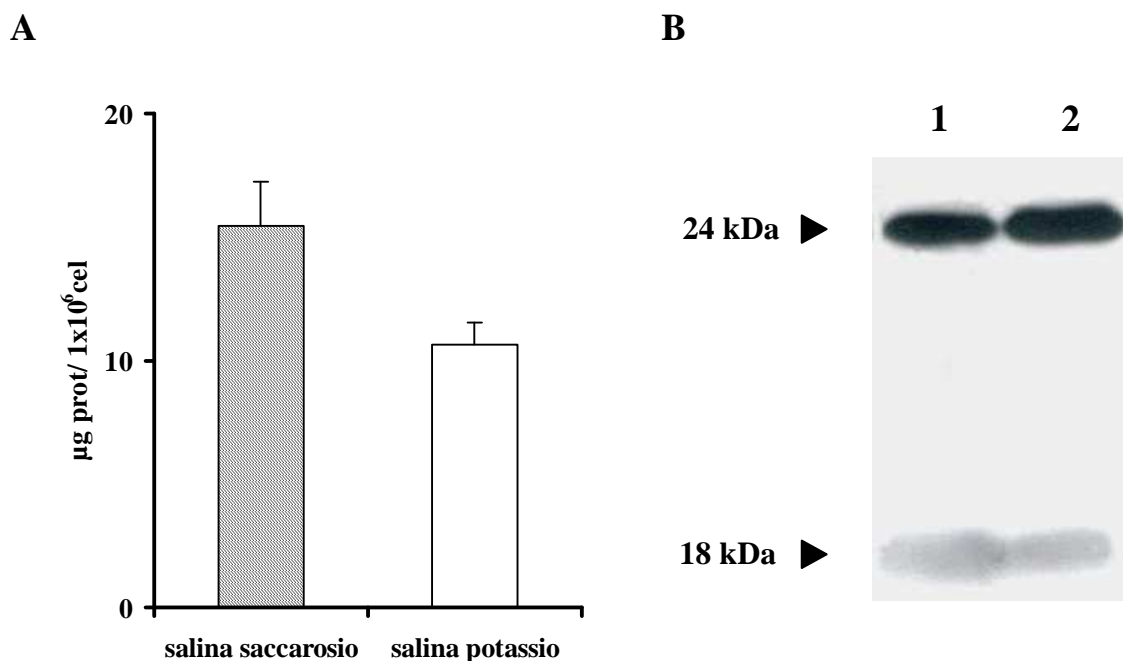


Figura 40) La stimolazione dei macrofagi in una salina ad elevata forza ionica determina una riduzione del rilascio di microvescicole (pannello A) ma non inibisce la maturazione dell' IL-18 (pannello B). I macrofagi sono stati trattati per 2 ore con 3 µg/ml LPS ed infine stimolati per 10 minuti con 200 µM BzATP. Pannello A: la stimolazione in una salina ad elevato contenuto di potassio riduce il rilascio di microvescicole di circa il 30%. Pannello B: dall'analisi tramite Western blot è stato possibile osservare come le vescicole contengano sia la forma matura che immatura della citochina, confermando che accumulo e maturazione della citochina avvengono mediante un meccanismo indipendente dalla caspasi. 1. vescicole ottenute da macrofagi stimolati in salina saccarosio; 2. vescicole ottenute da macrofagi stimolati in salina ad elevato contenuto di potassio. Le proteine sono state analizzate su gel al 12% acrilamide.

L'incubazione e la stimolazione dei macrofagi in soluzione salina, ad elevato contenuto di potassio, riduce il rilascio di microvescicole (**Figura 40**, pannello A), ma non influenza la maturazione della citochina, come già osservato in seguito al pretrattamento con Y-VAD (**Figura 40**, pannello B).

Questi dati suggeriscono quindi, come la stimolazione dei macrofagi in una soluzione ad elevata forza ionica determini una diminuzione del 30% nel rilascio di microvescicole, senza però influenzare la maturazione e l'accumulo di IL-18.

L'assenza di calcio extracellulare riduce la concentrazione di IL-18 nelle vescicole

Per verificare se l'assenza di Ca^{2+} si ripercuote anche sulla concentrazione della citochina presente nelle vescicole, i macrofagi sono stati incubati con LPS e stimolati con BzATP in una soluzione salina saccarosio priva di Ca^{2+} ed in presenza di EGTA.

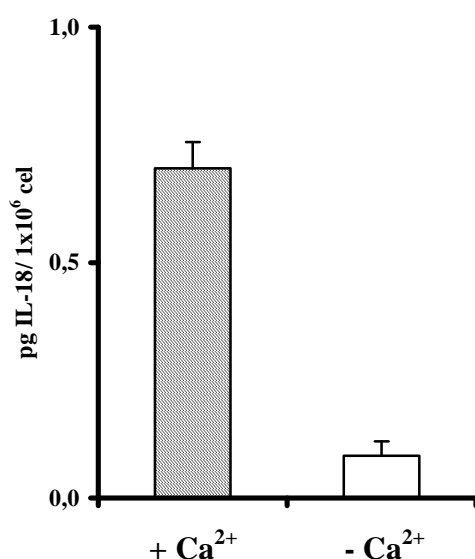


Figura 41) La concentrazione di IL-18, presente nelle microvescicole, diminuisce in assenza di Ca^{2+} extracellulare. I macrofagi sono stati pretrattati con 3 $\mu\text{g/ml}$ LPS e in seguito stimolati con 200 μM BzATP in soluzione salina saccarosio in cui il Ca^{2+} extracellulare è stato chelato con 0.5 mM EGTA.

La **Figura 41** mostra come in assenza di calcio extracellulare la quantità di citochina presente nelle vescicole sia notevolmente ridotta (87%), in maniera simile a quella del rilascio di microvescicole.

Le microvescicole esprimono il recettore P2X₇

Dato che i macrofagi esprimono il sottotipo P2X₇ è presumibile che le microvescicole, quando rilasciate, portino con sè parte della membrana della cellula e quindi anche tale recettore. La figura sotto riportata mostra come il recettore sia effettivamente presente non solo a livello dei macrofagi, ma anche nelle microvescicole.

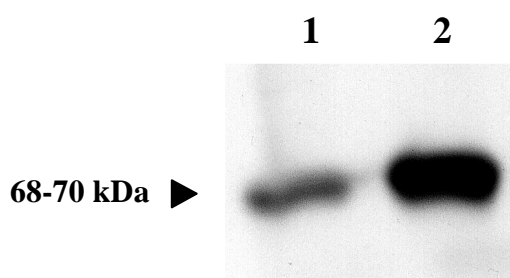


Figura 42) P2X₇ è espresso nelle microvescicole. 1. macrofagi; 2. vescicole ottenute da macrofagi trattati in salina saccarosio per 2 ore con 3 µg/ml LPS e per 10 minuti con 200 µM BzATP. Le proteine sono state analizzate su gel al 12% acrilamide.

Le microvescicole contengono i componenti dell'inflammasoma

Recentemente ha destato molto interesse la scoperta di un complesso proteico responsabile dell'attivazione delle caspasi-1 e -5 e in grado di determinare l'elaborazione e la secrezione delle citochine infiammatorie IL-1 β e IL-18. Tale complesso, meglio conosciuto col nome di "inflammasoma", viene a costituirsi in seguito a stimoli patogeni e si è visto, inoltre, come il NALP3-inflammasoma possa essere attivato da "danger signals" endogeni, quale l'ATP in seguito a infiammazione o a danno tissutale (Kanneganti et al., 2006; Mariathasan et al., 2006).

La mia attenzione si è focalizzata su quest'ultimo tipo di inflammasoma e sono andata ad investigare la presenza dei suoi costituenti all'interno delle microvescicole.

I macrofagi sono stati stimolati con BzATP al fine di ottenere le microvescicole e attraverso Western blot ho verificato la presenza delle proteine NALP3 (**Figura 43**, pannello A), caspasi-1 (**Figura 43**, pannello B), CARDINAL (**Figura 43**, pannello C), e ASC (**Figura 43**, pannello D).

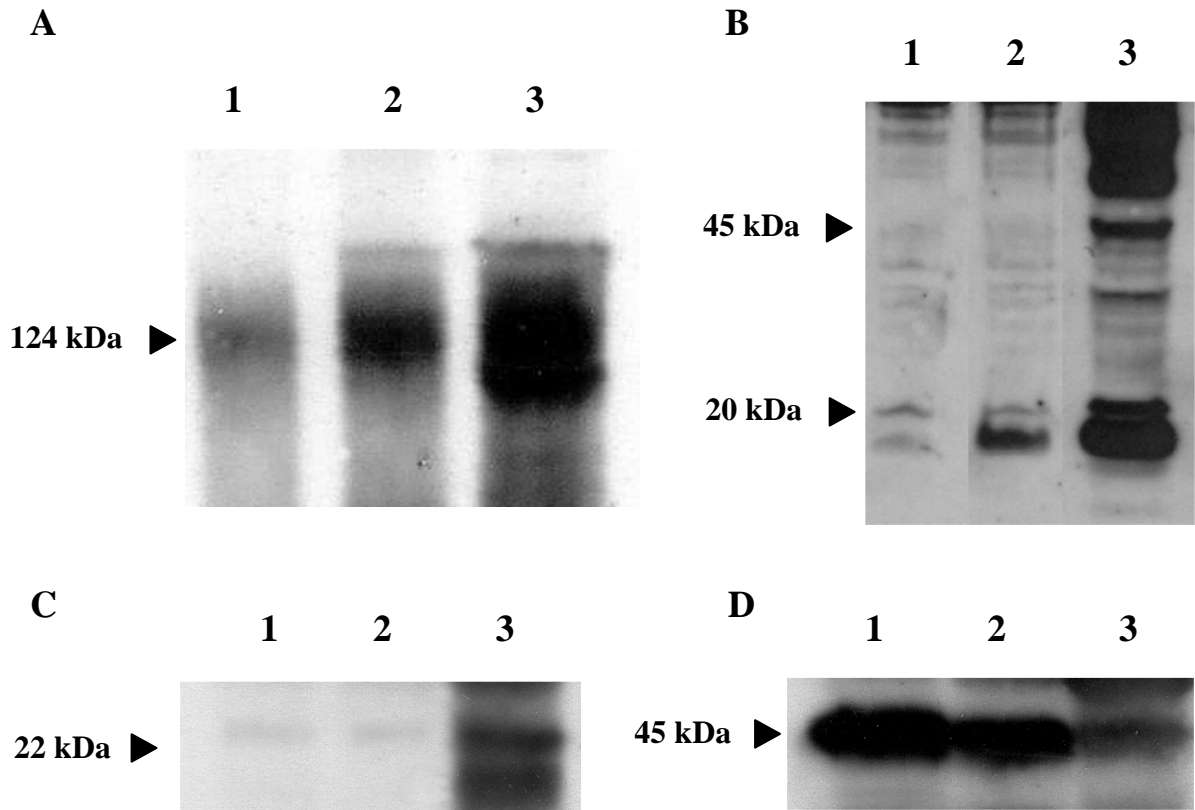


Figura 43) Le microvescicole contengono i componenti dell'inflammasoma. Pannello A: NALP3; pannello B: caspasi-1; pannello C: ASC; pannello D: Cardinal. 1. vescicole ottenute da macrofagi trattati per 2 ore con LPS 3 $\mu\text{g/ml}$ e per 10 minuti con 200 μM BzATP; 2. vescicole ottenute da macrofagi trattati per 10 minuti con 200 μM BzATP; 3. macrofagi.

DISCUSSIONE

I monociti/macrofagi svolgono un ruolo centrale nelle fasi iniziali della difesa antimicrobica prima che venga attivata la risposta mediata dai linfociti T e B. I macrofagi rispondono all'LPS producendo TNF- α , che a sua volta, induce la sintesi di IL-1.

TNF- α e IL-1 stimolano le cellule endoteliali a produrre altre citochine (per es. IL-6 e IL-8) e molecole di adesione. L'iniziale rilascio di LPS, di conseguenza, dà origine ad una cascata di citochine che aumenta la risposta infiammatoria e potenzia l'eliminazione dei microrganismi.

I nucleotidi extracellulari ATP, ADP, UTP e UDP sono stati riconosciuti come segnali di danno in grado di attivare diversi tipi cellulari tra cui cheratinociti e macrofagi. L'ATP ad esempio si trova nel citoplasma della cellula ad una concentrazione compresa tra 5 e 10 nM, ma può essere anche rilasciato in condizioni di stress ossidativo, infiammazione, ipossia o ischemia.

I macrofagi così come i cheratinociti esprimono recettori purinergici P2X e P2Y attivati dai nucleotidi extracellulari, capaci di indurre tutta una serie di eventi tra cui aumento della concentrazione del calcio intracellulare, riorganizzazione del citoscheletro, chemiotassi, produzione di ossido nitrico e radicali dell'ossigeno.

L'ATP extracellulare è anche un potente stimolo per la secrezione della citochina proinfiammatoria IL-18 da parte dei macrofagi umani. La secrezione della citochina richiede il pretrattamento dei macrofagi con endotossina batterica.

L'attività proinfiammatoria dell'IL-18 è dovuta alla sua capacità di stimolare la produzione di citochine infiammatorie, chemiochine, ossido nitrico e prostaglandine, ed è amplificata dalla capacità di indurre la produzione dell'IFN- γ , che a sua volta attiva i macrofagi.

In questa tesi mi sono proposta di studiare gli effetti mediati dalla stimolazione dei recettori P2 in cheratinociti e macrofagi.

Per quanto riguarda il primo tipo cellulare, si è dapprima analizzato tramite RT-PCR, quali siano i recettori P2 espressi dai cheratinociti, poichè in letteratura il materiale è scarso e frammentario; successivamente ho misurato le risposte calcio dovute alla stimolazione con i nucleotidi extracellulari. Questi dati hanno messo in evidenza come i cheratinociti umani esprimano diversi sottotipi P2 e come questi siano anche funzionali.

L'attenzione poi si è rivolta allo studio degli effetti che alcune citochine, importanti in patologie della cute, quali psoriasi e dermatite atopica, svolgono sull'espressione e sulla funzionalità dei recettori P2. L'analisi tramite RT-PCR ha messo in evidenza come il trattamento con IL-4 o IFN- γ induce un aumento nell'espressione dell'mRNA per i sottotipi P2Y₁ e P2X₇. L'aumentata espressione, non si traduce però, in un aumento della funzionalità di tali sottotipi, sia per quanto riguarda le risposte calcio, sia per le modificazioni morfologiche che rimangono caratterizzate da un semplice restringimento della membrana plasmatica, accompagnato dalla formazione di alcune blebs di membrana.

E' noto dalla letteratura come la stimolazione del recettore P2X₇ causi il rilascio di microvescicole in cellule HEK 293, monociti THP-1 e microglia (MacKenzie et al., 2001); lo studio, quindi, è proseguito analizzando l'emissione e il contenuto delle microvescicole prodotte dai macrofagi stimolati con agonisti dei recettori P2, osservando come i nucleotidi extracellulari determinino riduzione del volume cellulare, accompagnata dal rilascio di microvescicole. Successivamente è stato valutato il contenuto delle stesse verificando come contengano la citochina proinfiammatoria IL-18 e come il fenomeno sia P2X-dipendente (attivato da ATP e BzATP, bloccato da oATP) e influenzato dalla presenza di Ca²⁺ extracellulare.

E' noto dalla letteratura come esistano due forme della citochina IL-18: la forma immatura di 24 kDa e la forma matura di 18 kDa. Dopo aver verificato la presenza della citochina nelle microvescicole, ho determinato in che forma fosse al loro interno, stabilendo come siano presenti sia quella immatura che quella matura; l'emissione potrebbe rappresentare un sistema per il rilascio di proteine citoplasmatiche che non hanno sequenze leader per la secrezione come l'IL-18 e l'IL-1 β (MacKenzie et al., 2001).

Poiché la caspasi-1 è responsabile del taglio proteolitico dell'IL-18 determinandone la trasformazione/conversione nella forma matura (Gu et al., 1997), ho pretrattato i macrofagi con Y-VAD, un inibitore della caspasi, allo scopo di verificare se anche il rilascio delle microvescicole e soprattutto il "caricamento" delle stesse con la citochina, sia dipendente dall'attività caspasi, ed ho osservato come il processo sia da essa indipendente.

Dallo studio è poi emerso come il recettore P2X₇, oltre ad essere presente nelle cellule, sia espresso ad elevati livelli anche nelle microvescicole. Il significato di tale fenomeno è sconosciuto, si potrebbe ipotizzare che l'emissione di vescicole avvenga preferibilmente in zone della membrana in cui è presente il recettore o che il recettore stesso stimoli il rilascio delle vescicole e poi permanga sulle membrane delle stesse mentre la vescicola viene emessa. Il recettore P2X₇ espresso nelle microvescicole potrebbe a sua volta essere stimolato dall'ATP rilasciato da cellule circostanti o presente nell'ambiente extracellulare. Ciò determinerebbe la rottura della microvescicola consentendo la liberazione della citochina, che potrebbe così stimolare le cellule vicine.

In ultima analisi ho analizzato la presenza delle varie proteine che costituiscono il complesso conosciuto come "inflammasoma", all'interno delle microvescicole. Da questa analisi è emerso come NALP3, ASC, CARDINAL e la caspasi-1 siano effettivamente presenti non solo nei macrofagi ma anche contenuti all'interno delle microvescicole che vengono rilasciate dagli stessi in seguito alla stimolazione con BzATP.

Da questo tesi emerge come i recettori P2 espressi sia nei cheratinociti che nei macrofagi siano in grado di indurre risposte potenzialmente importanti nell'inflammazone.

BIBLIOGRAFIA

Abbracchio MP, Burnstock G (1994). Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* **64**, 445-75.

Abbracchio MP, Burnstock G (1998). Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol* **2**, 113-145.

Akaiwa M, Yu B, Umeshita-Suyama R, Terada N, Suto H, Koga T, Arima H, Matsushita S, Saito H, Ogawa H, Furue M, Hamasaki N, Ohshima K, Izuhara K (2001). Localization of human interleukin 13 receptor in non-haematopoietic cells. *Cytokine* **13**, 75-84.

Albanesi C, Scarponi C, Sebastiani S, Cavani A, Federici M, De Pita O, Puddu P, Girolomoni G (2000). IL-4 enhances keratinocyte expression of CXCR3 agonistic chemokines. *J Immunol* **165**, 1395-1402.

Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, Squarcina P, Accorsero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Permiani G, Fais S (2002). Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* **195**, 1303-1316.

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 (2002). Functional downregulation of P2X3 receptor subunit in rat sensory neurons reveals a significant role in chronic neuropathic and inflammatory pain. *J Neurosci* **22**, 8139-8147.

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

Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA (1997). Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* **99**, 2118-2127.

Barry OP, Kazanietz MG, Pratico D, FitzGerald GA (1999). Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* **274**, 7545-7556.

Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, Carmeliet P, Muller BM, Friedlander M, Ruf W (2004). Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signalling. *Nat Med* **10**, 502-509.

Bennet BL, Cruz R, Lacson RG, Manning AM (1997). Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor alpha-stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF-kappaB. *J Biol Chem* **272**, 10212-10219.

Berchtold S, Ogilvie AL, Bogdan C, Muhl-Zurbes P, Ogilvie A, Schuler G, Steinkasserer A (1999). Human monocyte derived dendritic cells express functional P2X and P2Y receptors as well as ecto-nucleotidases. *FEBS Lett* **458**, 424-428.

Berman MC (1999). Regulation of Ca²⁺ transport by sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase at limiting [Ca²⁺]. *Biochim Biophys Acta* **1418**, 48-60.

Bianco R, Daniele G, Ciardiello F, Tortara G (2005). Monoclonal antibodies targeting the epidermal growth factor receptor. *Curr Drug Targets* **6**(3), 275-287.

Born TL, Thomassen E, Bird TA, Sims JE (1998). Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signalling. *J Biol Chem* **273**, 29445-29450.

Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimi T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, Mallat Z (2001). Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* **104**, 2649-2652.

Boue-Grabot E, Archambault V, Seguela P (2000). A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X₂ ATP-gated channels. *J Biol Chem* **275**, 10190-10195.

Brodsky SV, Zhang F, Nasjetti A, Gollgorsky MS (2004). Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**, H1910-H1915.

Brossart P, Grunebach F, Stuhler G, Reichardt VL, Mhle R, Kanz L, Brugger W (1998). Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **92**, 4238-4247.

Buell G, Collo G, Rassendren F (1996). P2X receptors: an emerging channel family. *Eur J Neurosci* **8**, 2221-2228.

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

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

Chambers JK, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, Zhu Y, McLaughlin MM, Murdock P, McMillan L, Trill J, Swift A, Aiyar N, Taylor P, Vawter L, Naheed S, Szekeres P, Hervieu G, Scott C, Watson JM, Murphy AJ, Duzic E, Klein C, Bergsma DJ, Wilson S, Livi GP (2000). A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem* **275**, 10767-10771.

Chu Z, Pio F, Xie Z, Welsh K, Krajewska M, Krajewski S, Godzik A, Reed JC (2001). A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 9239-9245.

Chvatchko Y, Valera S, Aubry JP, Renno T, Buell G, Bonnefoy J (1996). The involvement of an ATP-gated ion channel, P2X₁, in thymocyte apoptosis. *Immunity* **5**, 275-283.

Clarke CE, Benham CD, Bridges A, George AR, Meadows HJ (2000). Mutation of histidine 286 of human P2X₄ purinoceptor removes extracellular pH sensitivity. *J Physiol* **523**, 697-703.

Cockcroft S, Gomperts BD (1980). The ATP⁴⁻ receptor of rat mast cells. *Biochem J* **188**, 789-798.

Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM (1997a). Cloning of human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **272**, 31969-31973.

Communi D, Boeynaems JM (1997b). Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides. *Trends Pharmacol Sci* **18**, 83-86.

Communi D, Janssens R, Robaye B, Zeelis N, Boeynaems JM (2000). Rapid up-regulation of P2Y messengers during granulocytic differentiation of HL-60 cells. *FEBS Lett* **475**, 39-42.

Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, Boeynaems JM (2001). Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem* **276**, 41479-41485.

Coutinho-Silva R, Persechini PM, Bisaggio RD, Perfettini JL, Neto AC, Kanellopoulos JM, Motta-Ly I, Dautry-Varsat A, Ojcius DM (1999). P2Z/P2X₇ receptor-dependent apoptosis of dendritic cells. *Am J Physiol* **276**, C1139-C1147.

Daliani D, Ulmer RA, Jackow C, Pugh W, Gansbacher B, Cabanillas F, Duvic M, Sarris AH (1998). Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma, but not HTLV-I tax, are likely factors in the epidermotropism of cutaneous T-cell lymphoma via induction of interferon-inducible protein-10. *Leuk Lymphoma* **29**, 315-328.

Dancescu M, Rubio-Trujillo M, Biron G, Bron D, Delespesse G, Sarfati M (1992). Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. *J Experimental Medicine* **176**, 1319-1326.

Delinger LC, Fisette PL, Garis KA, Know G, Vasquez-Torres A, Simon AD, Nguyen B, Proctor RA, Bertics PJ, Carbett JA (1996). Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *J Biol Chem* **271**, 337-342.

Dichmann S, Idzko M, Zimpfer U, Hofmann C, Ferrari D, Luttmann W, Virchow C Jr, Di Virgilio F, Norgauer J (2000). Adenosine triphosphate-induced oxygen radical production and CD11b up-regulation: Ca²⁺ mobilization and actin reorganization in human neutrophils. *Blood* **95**, 973-978.

Dinarello CA (1998). Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta convertase enzyme. *Ann NY Acad Sci* **29**, 1-11.

Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, Falzoni S, Sanz JM, Morelli A, Torboli M, Bolognesi G, Baricordi OR (2001). Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* **97**, 587-600.

Dubyack GR, el-Moatassim C (1993). Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* **265**, C577-C606.

Dubyack GR, Clifford EE, Hunphreys BD, Kertesy SB, Martin KA (1996). Expression of multiple ATP receptor subtypes during the differentiation and inflammatory activation of myeloid leukocytes. *Drug Dev Res* **39**, 269.

Ennion S, Hagan S, Evans RJ (2000). The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X₁ receptors. *J Biol Chem* **275**, 29361-29367.

Erb L, Garrad R, Wang Y, Quinn T, Turner JT, Weisman GA (1995). Site-directed mutagenesis of P2U purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J Biol Chem* **270**, 4185-4188.

Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM, Koller BH (1999). Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med* **5**, 1199-1202.

Falzoni S, Munerati M, Ferrari D, Spisani S, Moretti S, Di Virgilio F (1995). The purinergic P2Z receptor of human macrophage cells. Characterization and possible physiological role. *J Clin Invest* **95**, 1207-1216.

Fantuzzi G, Puren AJ, Harding MW, Livingstone DJ, Dinarello CA (1998). Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice. *Blood* **91**, 2118-2125.

Ferrari D, Munerati M, Melchiorri L, Hanau S, Di Virgilio F, Baricordi OR (1994). Responses to extracellular ATP of lymphoblastoid cell lines from Duchenne muscular dystrophy patients. *Am J Physiol* **267**, C886-C892.

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

Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Hanau S, Di Virgilio F (1997). Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med* **185**(3), 579-582.

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

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

Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F (2006). The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* **176**, 3877-3883.

Fiorentino L, Stehlik C, Oliveira V, Ariza ME, Godzik A, Reed JC (2002). A novel PAAD-containing protein that modulates NF-kappa B induction by cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *J Biol Chem* **277**, 35333-35340.

Forlow SB, McEver RP, Nollert MU (2000). Leukocyte-leukocyte interaction mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* **95**, 1317-1323.

Fourcade O, Simon MF, Viodé C, Rugani N, Leballe F, Ragad A, Fournié B, Sarda L, Chap H (1995). Secretory phospholipase A₂ generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* **80**, 919-927.

Ghoreschi K, Thomas P, Breit S, Dugas M, Mailhammer R, van Eden W, van der Zee R, Biedermann T, Prinz J, Mack M, Mrowietz U, Christophers E, Schlondorff D, Plewig G, and Rocken M (2003). Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med* **9**(1), 40-46.

Greenberg SS, Zhao X, Wang JF, Hua L, Ouyang J (1997). cAMP and purinergic P2y receptors upregulate and enhance inducible NO synthase mRNA and protein in vivo. *Am J Physiol* **273**, L967-L979.

Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino k, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS (1997). Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* **275**, 206-209.

Gu BJ, Zhang W, Worthington RA, Sluyter R, Dao-Ung P, Petrou S, Barden JA, Wiley JS (2001). A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X₇ receptor. *J Biol Chem* **276**, 11135-11142.

Gu BJ, Sluyter R, Skarratt KK, Shemon AN, Dao-Ung LP, Fuller SJ, Barden JA, Clarke AL, Petrou S, Wiley JS (2004). An Arg307 to Gln polymorphism within the ATP-binding site causes loss of function of the human P2X₇ receptor. *J Biol Chem* **279**, 31287-31295.

Giebler HA, Lemasson I, Nyborg JK (2000). p53 recruitment of CREB binding protein mediated through phosphorylated CREB: a novel pathway of tumor suppressor regulation. *Mol Cell Biol* **20**, 4849, 4858.

Haschimoto W, Osaki T, Okamura H, Robbins PD, Kurimoto M, Nagata S, Lotze MT, Tahara H (1999). Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand and perforin-induced tumor apoptosis, respectively. *J Immunol* **163**, 583-589.

Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* **94**, 3791-3799.

Hickman SE, el Khoury J, Greenberg S, Schieren I, Silverstein SC (1994). P2Z adenosine triphosphate receptor activity in cultured human monocyte-derived macrophages. *Blood* **84**, 2452-2456.

Hlaing T, Guo R, Dilley KA, Loussia JM, Morrish TA, Shi MM, Vincenz C, Ward PA (2001). Molecular cloning and characterization of DEFCAP-L and -S, two isoforms of a novel member of the mammalian Ced-4 family of apoptosis proteins. *J Biol Chem* **276**, 9230-9238.

Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* **409**, 202-207.

Hou M, Malmsjo M, Moller S, Pantev E, Bergdahl A, Zhao XH, Sun XY, Hedner T, Edvinsson L, Erlinge D (1999). Increase in cardiac P2X1- and P2Y2-receptor mRNA levels in congestive heart failure. *Life Sci* **65**, 1195-1206.

Howie SE, Aldridge RD, McVittie E, Forsey RJ, Sands C, Hunter JA (1996). Epidermal keratinocyte production of interferon-gamma immunoreactive protein and mRNA is an early event in allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* **106**, 1218-1223.

Huber J, Vales A, Mitulovic G, Blumer M, Schmid R, Witztum JL, Binder BR, Leitinger N (2002). Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 101-107.

Humphreys BD, Dubyak GR (1998). Modulation of P2X₇ nucleotide receptor expression by pro- and anti-inflammatory stimuli in THP-1 monocytes. *J Leukoc Biol* **64**, 265-273.

Ishikawa S, Kawasumi M, Kusaka I, Komatsu N, Iwao N, Saito T (1994). Extracellular ATP promotes cellular growth of glomerular mesangial cells mediated via phospholipase C. *Biochem Biophys Res Commun* **202**, 234-240.

Jain N, Kemp N, Adeyemo O, Buchanan P, Stone TW (1995). Anxiolytic activity of adenosine receptor activation in mice. *Br J Pharmacol* **116**, 2127-2133.

Janeway CA, Travers P, Walport P, Shlomchik M (2003). Immunobiologia. Casa editrice Piccin, Padova.

Jiang LH, Rassendren F, Surprenant A, North RA (2000). Identification of amino acid residues contributing to the ATP binding site of a P2X receptor. *J Biol Chem* **275**, 34190-34196.

Junghans V, Jung T, Neumann C (1996). Human keratinocytes constitutively express IL-4 receptor molecules and respond to IL-4 with an increase in B7/BB1 expression. *Exp Dermatol* **5**, 316-324.

Kahlenberg JM, Dubyak GR (2004). Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol* **286**, C1100-1108.

Kanneganti TD, Özören N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Akira S, Núñez G (2006). Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* **440**, 233-236.

Khakh BS, Proctor WR, Dunwiddie TV, Labarca C, Lester HA (1999). Allosteric control of gating and kinetics at P2X₄ receptor channels. *J Neurosci* **19**, 7289-7299.

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

Kobayashi J, Inai T, Morita K, Moroi Y, Urabe K, Shibata Y, Furue M (2004). Reciprocal regulation of permeability through a cultured keratinocyte sheet by IFN-gamma and IL-4. *Cytokine* **28**, 186-189.

Kock A, Schwarz T, Kirnbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC, Luger TA (1990). Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med* **172**, 1609-1614.

Kupper TS, Ballard DW, Chua AO, McGuire JS, Flood PM, Horowitz MC, Langdon R, Lightfoot L, Gubler U (1986). Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin 1 alpha and beta mRNA. Keratinocyte epidermal cell-derived thymocyte-activating factor is identical to interleukin 1. *J Exp Med* **164**, 2095-2100.

Lamb GD, Stephenson DG (1992). Control of calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Adv Exp Med Biol* **311**, 289-303.

Lee BC, Cheng T, Adams GB, Attar EC, Miura N, Lee SB, Saito Y, Olszak I, Dombkowski D, Olson DP, Hancock J, Choi PS, Haber DA, Luster AD, Scadden DT (2003). P2Y-like receptor, GPR105 (P2Y14), identifies and mediates chemotaxis of bone-marrow hematopoietic stem cells. *Genes Dev* **17**, 1592-1604.

Lowenthal JW, Castle BE, Christiansen J, Schreurs J, Rennick D, Arai N, Hoy P, Takebe Y, Howard M (1998). Expression of high affinity receptors for murine interleukin 4 (BSF-1) on hemopoietic and nonhemopoietic cells. *J Immunol* **140**, 456-464.

MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A (2001). Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *Immunity* **15**, 825-835.

MacKenzie A, Young MT, Adinolfi E, Surprenant A (2005). Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J Biol Chem* **280**, 33968-33976.

Mackman N (2004). Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1015-1122.

Manji GA, Wang L, Geddes BJ, Brown M, Merriam S, Al-Garawi A, Mak S, Lora J, Briskin M, Jurman M, Cao J, DiStefano PS, Bertin J (2002). PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B. *J Biol Chem* **277**, 11570-11575.

Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228-232.

Martin S, Tesse A, Hugel B, Martinez MC, Morell O, Freyssinet JM, Andriantsitohaina R (2004). Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation* **109**, 1653-1659.

Mesri M, Altieri DC (1999). Leukocytes microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signalling pathway. *J Biol Chem* **274**, 23111-23118.

Molloy A, Laochumroonvorapong P, Kaplan G (1994). Apoptosis but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus *Calmette-Guèrin*. *J Exp Med* **180**, 1499-1509.

Morel O, Jesel L, Chauvin M, Freyssinet JM, Toti F (2003). Eptifibatide-induced thrombocytopenia and circulating procoagulant platelet-derived microparticles in a patient with acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost* **1**, 2685-2687.

Morelli A, Chiozzi P, chiesa A, Ferrari D, Sanz JM, Falzoni S, Pinton P, Rizzuto R, Olson MF, Di Virgilio F (2003). Extracellular ATP causes ROCK I-dependent bleb formation in P2X7-transfected HEK293 cells. *Mol Biol Cell* **14**, 2655-2664.

Muller CE (2001). A(3) adenosine receptor antagonists. *Med Chem* **1**, 417-427.

Mutini C, Falzoni S, Ferrari D, Chiozzi P, Morelli A, Baricordi OR, Collo G, Ricciardi-Castagnoli P, Di Virgilio F (1999). Mouse dendritic cells express the P2X₇ purinergic receptor: characterization and possible participation in antigen presentation. *J Immunol* **163**, 1958-1965.

Nakazawa K, Ohno Y (1999). Neighboring glycine residues are essential for P2X₂ receptor/channel function. *Eur J Pharmacol* **370**, R5-R6.

Neal JW, Clipstone NA (2003). Constitutively active NFATc1 mutant induces a transformed phenotype in 3T3-L1 fibroblasts. *J Biol Chem* **278**, 17246-17254

Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE (1999). The IL-4 Receptor: Signalling Mechanisms and Biologic Function. *Annu Rev Immunol* **17**, 701-38.

Newbolt A, Stoop R, Virginio C, Surprenant A, North RA, Buell G, Rassendren F (1998). Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). *J Biol Chem* **273**, 15177-15182.

Nicke A, Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G (1998). P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* **17**, 3016-3028.

Nihei OK, de Carvalho AC, Savino W, Alves LA (2000). Pharmacological properties of P2Z/P2X₇ receptor characterized in murine dendritic cells: role on the induction of apoptosis. *Blood* **96**, 996-1005.

Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J (2001). High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis* **158**, 277-287.

North RA (2003). The P2X3 subunit: a molecular target in pain therapeutics. *Curr Opin Investig Drugs* **4**, 833-840.

Numerof RP, Asadullah K (2006). Cytokine and anti-cytokine therapies for psoriasis and atopic dermatitis. *Bio Drugs* **20**(2), 93-103.

Ohara J, Paul WE (1987). Receptors for B-cell stimulatory factor-1 expressed on cells of haematopoietic lineage. *Nature* **325**, 537-540.

Pasquet JM, Dachary-Priget J, Nurden AT (1996). Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticles formation in platelets. *Eur J Biochem* **239**, 647-654.

Perregaux G, Gabel CA (1994). Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* **269**(21), 15195-15203.

Pfister SL (2004). Role of platelet microparticles in the production of tromboxane by rabbit pulmonary artery. *Hypertension* **43**, 428-433.

Pizzo P, Zanovello P, Bronte V, Di Virgilio F (1991). Extracellular ATP causes lysis of mouse thymocytes and activates a plasma membrane ion channel. *Biochem J* **274**, 139-144.

Proctor RA, Delinger LC, Leventhal PS, Daugherty SK, van de Loo Jn, Tanke T, Firestein GS, Bertics PJ (1994). Protection of mice from endotoxic death by 2-methylthio-ATP. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 6017-6020.

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

Ralevic V, Burnstock G (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol* **50**, 415-475.

Razmara M, Srinivasula SM, Wang L, Poyet J, Geddes BJ, DiStefano PS, Bertin J, Alnemri ES (2002). CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 13952-13958.

Rettinger J, Aschrafi A, Schmalzing G (2000). Roles of individual-glicans for ATP potency and expression of the rat P2X₁ receptor. *J Biol Chem* **275**, 33542-33547.

Robaye B, Boeynaems JM, Communi D (1997). Slow desensitization of the human P2Y₆ receptor. *Eur J Pharmacol* **329**, 231-236.

Roland M (2003). Interleukin 4 treatment of psoriasis: are pleiotropic cytokines suitable therapies for autoimmune diseases? *Trends Pharmacol Sci* **24**(12), 613-616.

Saito H, Ebisawa M, Reason DC, Ohno K, Kurihara K, Sakaguchi N, Ohgimi A, Saito E, Akasawa A, Akimoto K, et al. (1991). Extracellular ATP stimulates interleukin-dependent cultured mast cell and eosinophils through calcium mobilization. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **94**, 68-70.

Sanz JM, Di Virgilio F (2000). Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol* **164**, 4893-4898.

Satta N, Toti F, Feugeas O, Bohbot A, Dachary-Prigent J, Eschwege V, Hedman H, Freyssinet JM (1994). Monocyte vesiculation is a possible mechanism for dissemination of membrane-associated procoagulant activities and adhesion molecules after stimulation by lipopolysaccharide. *J Immunol* **153**, 3245-3255.

Saunders N, Dahler A, Jones S, Smith R, Jetten A (1996). Interferon-gamma as a regulator of squamous differentiation. *J Dermatol Sci* **13**(2), 98-106.

Schulze-Lohoff E, Zanner S, Ogilvie A, Sterzel RB (1992). Extracellular ATP stimulates proliferation of cultured mesangial cells via P2-purinergic receptors. *Am J Physiol* **263**, F374-F383.

Shemon AN, Sluyter R, Fernando SL, Clarke AL, Dao-Ung LP, SkarRatt KK, Saunders BM, Tan KS, Gu BJ, Fuller SJ, Britton WJ, Petrou S, Wiley JS (2006). A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X₇ function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *J Biol Chem* **281**, 2079-2086.

Shimegi S (1996). ATP and adenosine act as a mitogen for osteoblast-like cells (MC3T3-E1). *Calcif Tissue Int* **58**, 109-113.

Smith FM, Humphrey PPA, Murrel-Lagnado RD (1999). Identification of amino acids within the P2X₂ receptor C-terminus that regulate desensitization. *J Physiol* **520**, 91-99.

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

Steinberg TH, Silverstein SC (1987). Extracellular ATP⁴⁻ promotes cation fluxes in the J774 mouse macrophage cell line. *J Biol Chem* **262**, 3684-3688.

Stoll S, Muller G, Kurimoto M, Saloga J, Tanimoto T, Yamauchi H, Okamura H, Knop J, Enk AH (1998). Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. *J Immunol* **159**, 298-302.

Sugawara T, Gallucci RM, Simeonova PP, Luster MI (2001). Regulation and role of interleukin 6 in wounded human epithelial keratinocytes. *Cytokine* **15**, 328-336.

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

Thornhill MH, Wellicoms SM, Mahiouz DL, Lanchbury JS, Kyan-Aung U, Haskard DO (1991). Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J Immunol* **146**, 592-598.

Torres GE, Egan TM, Voigot MM (1998). N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X₂ receptor. *Biochemistry* **37**, 4845-4851.

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

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

van der Weyden L, Conigrave AD, Morris MB (2000). Signal transduction and white cell maturation via extracellular ATP and the P2Y₁₁ receptor. *Immunol Cell Biol* **78**, 369-374

Vanwijk MJ, Svedas E, Boer K, Nieuwland R, Vanbavel E, Kublickiene KR (2002). Isolated microparticles, but not whole plasma, from woman with preclampsia impair endothelium-dependent relaxation in isolated myometrial arteries from healthy pregnant woman. *Am J Obstet Gynecol* **187**, 1686-1693.

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

von Albertini M, Palmetshofer A, Kaczmarek E, Koziak K, Stroka D, Grey ST, Stuhlmeier KM, Robson SC (1998). Extracellular ATP and ADP activate transcription factor NF-kappa B and induce endothelial cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **248**, 822-829.

Wess J (1998). Molecular basis of receptor /G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* **80**, 231-264.

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

Wiley JS, Gargett CE, Zhang W, Snook MB, Jamieson GP (1998). Partial agonists and antagonists reveal a second permeability state of human lymphocyte P2Z/P2X₇ channel. *Am J Physiol* **275**, C1224-C1231.

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

Zhou Z, Monsma LR, Hume RI (1998). Identification of a site that modifies desensitization of P2X₂ receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **252**, 541-546.

RINGRZIAMENTI

Un'altra tappa importante nel mio cammino di studi è volta al termine, ma non senza difficoltà e fatiche, che sono riuscita a superare grazie alle persone che in questi tre anni mi sono state vicine ciascuna a modo suo.

Beh... questo lavoro non si sarebbe realizzato se non fosse grazie al Professor Francesco Di Virgilio che ha creduto in me e mi ha dato la possibilità di lavorare nel suo laboratorio a contatto con persone davvero speciali.

Prima fra tutti vorrei ringraziare il dott. Davide Ferrari, non solo per i suoi preziosi insegnamenti, ma soprattutto per l'amicizia e l'affetto che mi ha dimostrato in questi anni;

poi, come non citare la dott.ssa Cinzia Pizzirani, mi ha "iniziato" al laboratorio, e ancora adesso senza di lei mi sentirei un po' persa, sei il mio punto di riferimento!! ... come farò senza di te?!!

Le dott.sse Elena Adinolfi, Patrizia Pelegatti, Maria Cirillo e la neomamma "Gente", che sono riuscite con la loro professionalità a consigliarmi e con la loro allegria a rendere meno grigie certe giornate in laboratorio!

L'intero staff della sezione di patologia generale per i preziosi consigli e l'aiuto dato, ed in particolare le dott.sse: Simonetta Falzoni, Paola Chiozzi e il dott. Dario Lavagna.

Dopo questi doverosi ringraziamenti, alle persone con cui quotidianamente condivido le "gioie e i dolori" della ricerca, vorrei ringraziare le persone che più di tutte rappresentano un punto fermo nella mia vita: la mia famiglia.

La mia mamma e il mio papà, che oramai non vedono l'ora che me ne vada fuori di casa per non stressarli più... ma quante volte ve lo devo ricordare?? Io sarò il bastone della vostra vecchiaia, non vi disferete così facilmente di me!! No, scherzi a parte, anche se non ve lo dico spesso vi voglio tantissimo bene ed è soprattutto grazie agli insegnamenti che mi avete dato, al vostro amore e ai vostri consigli che sono riuscita ad arrivare fino qui!!

Non meno importante il mio fratellino, come farei senza di te? Grazie per tutto quello che mi dai e ricorda: c'è un tempo per ogni cosa!!!

E che dire della mia sorellona, grazie davvero di tutto ma soprattutto vorrei ringraziare te e Mario per avermi reso zia... è stato davvero il più bel regalo che avreste mai potuto farmi!! Non posso immaginare come sarebbe ora senza quella meraviglia! E... scusatemi per le mie continue incursioni in casa vostra e le continue richieste d'aiuto... per fortuna ci siete voi!!

Infine vorrei ringraziare un'ultima persona, senza la quale questi tre anni non sarebbero trascorsi così velocemente, soprattutto grazie alle nostre quotidiane pause tea... i raid al mercato... e le infinite risate... un'amica davvero speciale, di quelle che se ne incontrano solo una nella propria vita! Grazie davvero di tutto Giulia... per il tuo affetto, per la tua comprensione, per il tuo aiuto e perché riesci ancora a sopportarmi!!!