

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

---

Sede amministrativa del Dottorato di Ricerca

DIPARTIMENTO DI FISIOLOGIA E PATOLOGIA  
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TRIESTE

XVIII CICLO DEL DOTTORATO DI RICERCA  
IN PATOLOGIA SPERIMENTALE E CLINICA

## **RUOLO DEI MOVIMENTI DI IONI CLORURO NELLA DEGRANULAZIONE DEI LEUCOCITI NEUTROFILI UMANI**

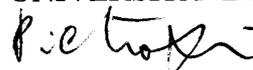
Settore scientifico disciplinare: MED/04 (Patologia generale)

DOTTORANDA:

**Dott. Elisa Trevisan**

COORDINATORE DEL COLLEGIO  
DEI DOCENTI  
CHIAR.MO PROF. PIERLUIGI  
PATRIARCA  
UNIVERSITA' DI TRIESTE

PER IL COORDINATORE  
PROF. PIERLUIGI PATRIARCA  
IL VICECOORDINATORE  
CHIAR.MO PROF. PIETRO DRI  
UNIVERSITA' DI TRIESTE



TUTORE  
DOTT. RENZO MENEGAZZI  
UNIVERSITA' DI TRIESTE

RELATORE  
DOTT. RENZO MENEGAZZI  
UNIVERSITA' DI TRIESTE

CORRELATORE  
DOTT.SSA SARA BUSETTO  
UNIVERSITA' DI TRIESTE

# ***Indice***

## ***1. Introduzione***

<b><i>1.1 I neutrofili</i></b>	<b><i>1</i></b>
<b><i>1.2 Ruolo dei PMN nel processo infiammatorio acuto</i></b>	<b><i>3</i></b>
<b><i>1.3 Fagocitosi e uccisione di microrganismi patogeni</i></b>	<b><i>4</i></b>
<b><i>1.4 Meccanismi microbicidi</i></b>	<b><i>6</i></b>
<b><i>1.4.1 Meccanismi ossigeno-dipendenti</i></b>	<b><i>6</i></b>
<b><i>1.4.2 Meccanismi ossigeno-indipendenti</i></b>	<b><i>9</i></b>
<b><i>1.5 Degranulazione</i></b>	<b><i>12</i></b>
<b><i>1.5.1 Meccanismo di trasporto e fusione tra membrana e granuli</i></b>	<b><i>13</i></b>
<b><i>1.5.1a Il coinvolgimento del citoscheletro</i></b>	<b><i>14</i></b>
<b><i>1.5.1b La fusione dei granuli alla membrana plasmatica</i></b>	<b><i>14</i></b>
<b><i>1.5.2 Segnali e meccanismi di traduzione del segnale mediati da recettori che provocano la degranulazione</i></b>	<b><i>16</i></b>
<b><i>1.6 Produzione e secrezione di chemochine</i></b>	<b><i>16</i></b>
<b><i>1.7 Analisi dei movimenti di ioni inorganici nella regolazione della funzionalità leucocitaria</i></b>	<b><i>18</i></b>
<b><i>1.7.1 Coinvolgimento delle variazioni <math>Ca^{2+}</math> intracellulare nella regolazione della funzionalità leucocitaria</i></b>	<b><i>19</i></b>
<b><i>1.7.2 Analisi del contenuto e dei movimenti di ioni cloruro nei PMN a riposo</i></b>	<b><i>21</i></b>
<b><i>1.7.2a Analisi del contenuto e dei movimenti di ioni cloruro nei PMN nella regolazione della funzionalità leucocitaria</i></b>	<b><i>22</i></b>
<b><i>2. Scopo</i></b>	<b><i>24</i></b>
<b><i>3. Materiali e Metodi</i></b>	
<b><i>3.1 Isolamento di leucociti polimorfonucleati neutrofili da sangue umano periferico</i></b>	<b><i>25</i></b>
<b><i>3.2 Coltura ed opsonizzazione di particelle fagocitabili</i></b>	<b><i>27</i></b>
<b><i>3.2.1 Coltura ed opsonizzazione di <i>Candida albicans</i></i></b>	<b><i>27</i></b>
<b><i>3.2.2. Coltura ed opsonizzazione di <i>Stafilococco aureus</i></i></b>	<b><i>28</i></b>

3.2.3 Opsonizzazione dello Zimosan	29
3.3 Marcatura di <i>C. albicans</i> con 5-(6)-carbossifluoresceina succinimidil estere [5-(6)-FAM-SE]	30
3.4 Valutazione dell'uccisione di <i>C. albicans</i> mediante conta delle unità formanti colonie (UFC)	31
3.5 Valutazione della produzione di $O_2^-$	32
3.6 Valutazione del metabolismo ossidativo in citofluorimetria a flusso	33
3.7 Degranulazione dei PMN sottoposti a stimoli di vario tipo	34
3.7.1 Dosaggio della mieloperossidasi (MPO)	34
3.7.2 Dosaggio dell'elastasi	35
3.7.3 Dosaggio della $\beta$ -glucuronidasi	35
3.7.4 Immobilizzazione di anticorpi su piastre derivatizzate con idrazide	36
3.7.5 Dosaggio della lattoferrina	37
3.8 Dosaggio della lattico deidrogenasi	39
3.9 Valutazione degli efflussi e del contenuto intracellulare di $Cl^-$ nei PMN	39
3.9.1 Valutazione degli efflussi di $^{36}Cl^-$ indotti da vari stimoli	39
3.9.2 Valutazione delle variazioni del contenuto intracellulare di $^{36}Cl^-$ ( $^{36}Cl^-$ ) indotte da <i>C. albicans</i>	40
3.9.3 Valutazione delle variazioni di $Cl^-$ tramite dosaggio chimico colorimetrico	42
3.10 Valutazione delle variazioni del $Ca^{2+}$ intracellulare in spettrofotofluorimetria (Fura 2-AM)	44
3.11 Preparazione di campioni per l'osservazione in microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	45
3.12 Inibitori del trasporto di ioni $Cl^-$	46
3.13 Inibitori delle vie di traduzione del segnale	47
<b>4. Risultati Prima Parte</b>	
4.1 Metodo per la valutazione dell'associazione e della fagocitosi di <i>Candida albicans</i> da parte dei PMN mediante citofluorimetria a	48

*flusso*

**4.2 Valutazione dell'uccisione di *C. albicans* mediante citofluorimetria a flusso** 50

## **5. Risultati Seconda Parte**

**5.1 Valutazione dei movimenti di ioni cloruro indotti da stimoli di diversa natura** 53

**5.2 Valutazione dell'efflusso di Cl in PMN stimolati con *C. albicans*** 54

**5.2.1 Valutazione delle variazioni del contenuto intracellulare di Cl in PMN stimolati da *C. albicans*** 55

**5.3 Ruolo della fagocitosi nell'attivazione degli efflussi di  $^{36}\text{Cl}$  nei PMN** 57

**5.4 Effetto degli inibitori degli efflussi di Cl sul riconoscimento e l'ingestione di *C. albicans*** 59

**5.5 Relazione tra efflussi di Cl e uccisione di *C. albicans*** 61

**5.6 Ruolo degli efflussi di ioni Cl nell'attivazione dei meccanismi microbicidi dei PMN** 62

**5.6.1 Correlazione tra efflussi di Cl e attivazione del metabolismo ossidativo** 63

**5.6.2 Correlazione tra efflussi di cloruro e rilascio di componenti granulari** 64

**5.6.3 Effetto degli inibitori del trasporto di ioni cloruro sulla degranolazione: analisi al microscopio elettronico a trasmissione** 67

**5.7 Effetto degli inibitori dei movimenti di ioni cloruro sulla degranolazione di PMN stimolati con stimoli solubili** 70

**5.7.1 Correlazione tra efflussi di ioni cloruro e degranolazione in PMN stimolati con fMLP** 70

**5.8 Correlazione tra movimenti di ioni cloruro e variazioni dei livelli citoplasmatici di  $\text{Ca}^{2+}$**  71

**5.8.1 Effetto degli inibitori del trasporto di cloruro sulle variazioni dei livelli citoplasmatici di calcio in cellule fagocitanti** 73

**5.8.2 Correlazione tra movimenti di ioni cloruro e variazioni della** 75

*concentrazione di calcio citoplasmatico in PMN stimolati con fMLP*

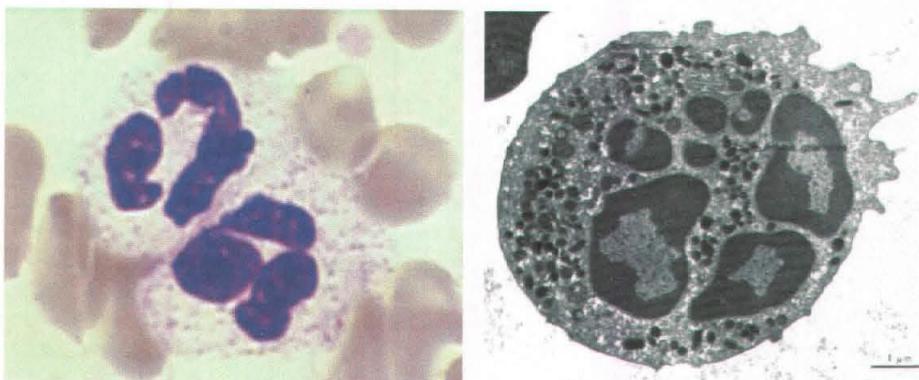
<b>5.9 Effetto degli inibitori dei movimenti di ioni cloruro sul rilascio di calcio dagli stores intracellulari in PMN stimolati con <i>C. albicans</i> ed fMLP</b>	76
<b>5.10 Modulazione dei movimenti di ioni cloruro e delle variazioni del calcio intracellulare in PMN stimolati con dosi crescenti di fMLP</b>	78
<b>5.11 Studi sui segnali intracellulari coinvolti nell'attivazione dei movimenti di cloruro in PMN stimolati con fMLP e <i>C. albicans</i></b>	80
5.11.1 Vie di segnalazione attivate dal recettore per l'fMLP	80
5.11.2 Vie di segnalazione attivate dai recettori per le opsonine	82
5.11.2a Recettore per l'Fcγ	82
5.11.2b Recettore per il C3b	83
5.11.3 Attivazione della fosfolipasi C	85
<b>5.12 Effetto di inibitori delle vie di segnalazione intracellulare sull'attivazione degli efflussi di cloruro</b>	86
5.12.1 Effetto delle tossine pertossiche sugli efflussi di Cl <sup>-</sup>	86
5.12.2 Effetto dell'inibizione di tirosin-chinasi sugli efflussi di Cl <sup>-</sup>	88
5.12.3 Effetto dell'inibizione delle PLC attivate da G protein sugli efflussi di Cl <sup>-</sup>	89
5.12.4 Effetto dell'inibizione della IP3-chinasi sugli efflussi di Cl <sup>-</sup>	91
6. Discussione e Conclusioni	94
7. Bibliografia	96

# 1. Introduzione

## 1.1 I neutrofili

I leucociti polimorfonucleati neutrofili (PMN) sono le prime cellule a raggiungere i tessuti danneggiati: essi infatti svolgono un'importante funzione nell'immunità innata, rappresentando la prima barriera difensiva contro qualsiasi agente lesivo. Sono prodotti a livello del midollo osseo emopoietico, dove avviene la loro maturazione prima di essere rilasciati nel circolo ematico, mentre la loro funzione si esplica al di fuori del torrente ematico, all'interno dei tessuti.

Al microscopio ottico essi appaiono come cellule di 12-14  $\mu\text{m}$  di diametro, caratterizzate da un nucleo polilobato, con 2-5 lobi distinti uniti da sottili fili di materiale nucleare, costituito da cromatina altamente condensata, indice di un basso grado di sintesi proteica (il numero dei lobi varia a seconda dall'età della cellula). Nelle donne il cromosoma X inattivo si presenta sottoforma di corpuscolo a clava estroflesso dal nucleo detto corpo di Barr (*Wheater, 1988*). Il citoplasma appare di colore chiaro, contiene pochi organelli tra cui alcuni resti del reticolo endoplasmatico rugoso, ribosomi liberi e resti del Golgi. Insieme ad eosinofili e basofili, i neutrofili vengono definiti granulociti per la presenza di granuli evidenti nel citoplasma. In particolare i granulociti neutrofili contengono quattro tipi di granuli: granuli primari o azurofilici, granuli secondari o specifici, granuli terziari e granuli secretori o "vescicole secretorie" (Figura 1.1).



**Figura 1.1** Leucocita polimorfonucleato neutrofilo fotografato al microscopio ottico da striscio di sangue (a, 1000x) e al microscopio elettronico a trasmissione (b, 15.000x).

I **granuli primari o azurofilii**, visibili al microscopio elettronico come granuli di grandi dimensioni (diametro di circa 320 nm) ed elettrondensi, sono ben visibili anche al microscopio ottico. La loro formazione inizia nel promielocita e termina nel mielocita, quando iniziano a formarsi gli specifici. Gli azurofilii saranno quindi presenti in numero minore nella cellula matura poiché dopo la loro formazione le cellule continuano a replicarsi ed i granuli vengono quindi diluiti nelle cellule figlie che, al contrario, continuano a produrre altri tipi di granuli. Essi contengono mieloperossidasi (MPO), defensine, idrolasi acide, lisozima, elastasi, serprocidine e una proteina che aumenta la permeabilità della membrana dei microrganismi (BPI). Sulla membrana di questi granuli è espresso come marker di superficie il CD63.

I **granuli secondari o specifici**, più numerosi dei primari ma più piccoli, hanno un diametro di 240 nm, sono appena visibili al microscopio ottico ed appaiono poco elettrondensi al microscopio elettronico. Questi granuli sono definiti anche secondari perché si formano più tardi degli azurofilii e più precisamente quando cessa la produzione di questi ultimi e la cellula continua a dividersi. La formazione dei granuli specifici continua fino agli stadi terminali della differenziazione del neutrofilo. Contengono lisozima, lattoferrina, una proteina legante la vitamina B<sub>12</sub>, gelatinasi e collagenasi, PLA<sub>2</sub>, fosfatasi alcalina, glicoproteine di adesione e il citocromo b<sub>245</sub>, componente essenziale della NADPH ossidasi. Marker di membrana è il CD66b.

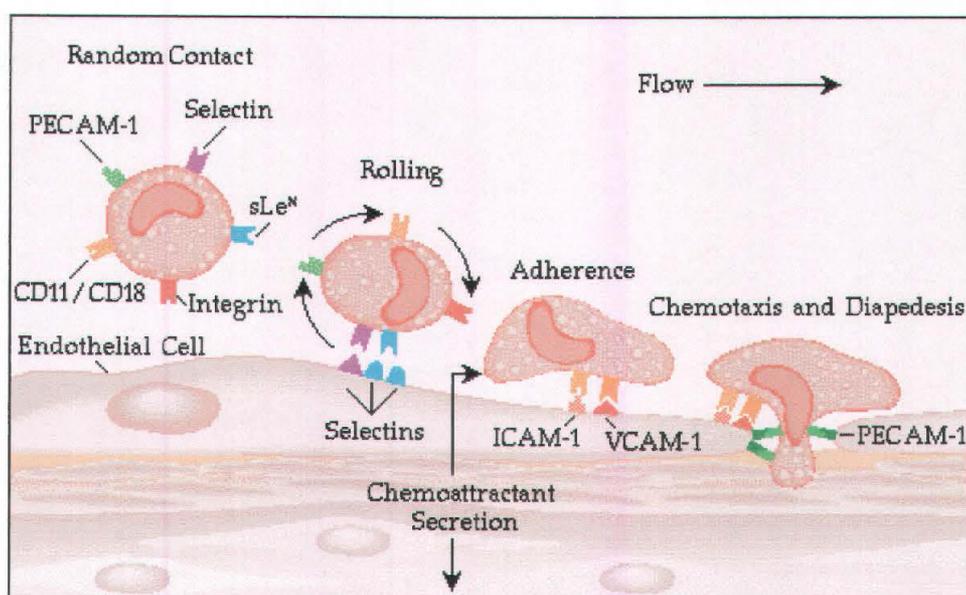
I **granuli terziari**, presentano un diametro di 190 nm ed un alto contenuto di gelatinasi; non presentano marker di membrana.

I **granuli secretori o "vescicole secretorie"**, piccoli e rotondeggianti, hanno un diametro di 100 nm, contengono fosfatasi alcalina sulla loro superficie luminale ed altre sostanze presenti anche negli altri tipi di granuli; sulla membrana è inoltre presente come marker il CD35 (Berton G., 1999; Wheeler, 1988; Lee W.L., 2003).

## 1.2 Ruolo dei PMN nel processo infiammatorio acuto

I PMN, definiti anche fagociti professionali, svolgono un ruolo di primaria importanza nel processo infiammatorio acuto rappresentando la prima linea di difesa nei confronti di microrganismi patogeni. Questi leucociti inoltre possono prolungare il processo infiammatorio inducendo danni tissutali tramite produzione di enzimi, mediatori chimici e sostanze tossiche.

Punto cruciale dell'infiammazione acuta è l'accumulo di PMN a livello del sito di infezione, processo che prende il nome di “*extravasazione*” e che si svolge in più fasi.



**Figura 1.2: Extravasazione dei neutrofili:** L'endotelio vascolare adiacente alla sede di flogosi secerne sostanze attivanti i neutrofili e mobilizza selettine. I neutrofili circolanti agganciano l'endotelio attraverso specifici ligandi per selettine. Questa interazione promuove il *rolling* dei neutrofili lungo l'endotelio e induce l'esocitosi dei granuli che rilasciano integrine; queste mediano l'adesione stabile all'endotelio e promuovono la trasmigrazione. Il movimento dei neutrofili attraverso la membrana basale è favorito dal rilascio di MMPs collagenolitiche dai granuli contenenti gelatinasi.

Nelle prime fasi della risposta infiammatoria si evidenzia un rallentamento del flusso sanguigno, a livello del microcircolo del sito di flogosi, che determina l'avvicinamento e l'accumulo di PMN in prossimità dell'endotelio; questa prima fase viene definita “*marginazione*”. Successivamente, si assiste ad un vero e proprio rotolamento (*rolling*) dei PMN sulla superficie dell'endotelio, che ne favorisce il progressivo rallentamento. Questa fase è sostenuta da interazioni adesive deboli tra i PMN e le cellule endoteliali mediate da molecole di adesione specifiche, le selectine. In

seguito queste interazioni divengono più stabili grazie all'aumentata espressione e/o attivazione di un'altra classe di molecole di adesione, le integrine ( $\alpha_L\beta_2$  e  $\alpha_M\beta_2$ ); fenomeno che determina l'arresto definitivo dei PMN sull'endotelio (**adesione**) (Kumar, 2005).

I PMN sono inoltre in grado di oltrepassare la barriera endoteliale grazie all'espressione di una terza classe di molecole di adesione le PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1). Queste molecole che normalmente permettono la giunzione tra cellule endoteliali (legame omofilico), durante i processi di **diapedesi** o **trasmigrazione** mediano il legame tra cellule endoteliali e PMN, permettendo il passaggio (meccanismo a cerniera) e l'accumulo di questi ultimi a ridosso della membrana basale sottostante. Studi recenti hanno messo in evidenza il coinvolgimento di una seconda molecola, appartenente alla superfamiglia delle Ig, nel processo di trasmigrazione denominata JAM (junctional adhesion molecule). Le JAM sono espresse sulle cellule endoteliali dove sono selettivamente concentrate nelle "tight junction" endoteliali, mentre non sono presenti sui PMN. Non si conosce ancora il contro-recettore presente sui neutrofili ma studi dimostrano che anticorpi anti-JAM inibiscono la trasmigrazione leucocitaria (Witko-Sarsat V. et al. 2000).

Guidati da fattori chemiotattici quali citochine (TNF- $\alpha$ , IL-8), componenti del complemento (C5a), prodotti di derivazione batterica (fMLP), prodotti del metabolismo dell'acido arachidonico (leucotriene B4), che diffondono dal sito di infezione, i PMN iniziano la migrazione verso il focolaio di infiammazione (**chemiotassi**) (Kumar, 2005).

### ***1.3 Fagocitosi e uccisione di microrganismi patogeni***

Il processo che porta all'uccisione, da parte dei PMN, di microrganismi patogeni presenti in sede d'infezione può essere suddiviso in più fasi: riconoscimento ed adesione alla particella da fagocitare, ingestione, uccisione e digestione dei microrganismi.

Il **riconoscimento** e l'**adesione** alle particelle da fagocitare avviene grazie alle presenza di recettori specifici sulla membrana plasmatica dei PMN che sono in grado di riconoscere in maniera efficiente i microrganismi solamente quando questi sono opsonizzati, cioè rivestiti da anticorpi e/o frammenti del complemento (opsonine). I

recettori coinvolti nel processo di riconoscimento e adesione delle particelle fagocitabili sono infatti recettori che riconoscono la porzione Fc delle immunoglobuline G (FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIIB) e i recettori per il fattore del complemento C3b (CR1 o CR3) (Anderson C.L. et al. 1990; Greenberg S. 1999). Tra questi recettori, FcγRIIA (CD32A) e CR3 sono i recettori funzionali della fagocitosi mentre CR1 e FcγRIIIB (CD16B) sono dei co-recettori che facilitano la funzione del primo recettore. Le vie di trasmissione del segnale mediate da queste due classi di recettori sono diverse, come sono diversi i processi di fagocitosi da essi promossi (Lee W.L. et al. 2003; Kumar, 2005; Witko-Sarsat et al. 2000).



**Figura 1.3** Neutrofilo fagocitante fotografato al microscopio elettronico a trasmissione (b, x15.000).

L'adesione tra la cellula bersaglio opsonizzata e i recettori presenti sulla superficie dei PMN dà inizio quindi al processo di avvolgimento della membrana del fagocita attorno alla particella, che richiede il contatto continuo dei recettori con i ligandi specifici. La fagocitosi è dunque un meccanismo mediato dalla formazione di pseudopodi, che si estendono in contatto continuo con la superficie del microrganismo, fino a fondersi tra loro formando il cosiddetto fagosoma (meccanismo a cerniera) (Alberts B. et al. 1991). La formazione dei pseudopodi, indotta dal riconoscimento, è legata a modificazioni del citoscheletro actinico. Infatti, sostanze in grado di interferire con l'assemblaggio e il disassemblaggio di componenti citoscheletriche (per esempio le citocalasine B e D), esercitano un effetto inibitorio sul processo della fagocitosi. Successivamente si assiste alla fusione tra il fagosoma ed i granuli citoplasmatici, che porta alla formazione del fagolisosoma, vacuolo nel quale avviene da prima l'azione citocida e poi quella digestiva nei confronti dell'agente patogeno ingerito.

## 1.4 Meccanismi microbicidi

L'attività microbica dei neutrofili comprende vari meccanismi che vengono convenzionalmente divisi in due categorie: meccanismi ossigeno-dipendenti e meccanismi ossigeno-indipendenti.

### 1.4.1 Meccanismi ossigeno-dipendenti

Una caratteristica peculiare dei neutrofili è di rispondere all'attivazione da parte di stimoli solubili e particolati con un marcato aumento del metabolismo ossidativo basale. Questo fenomeno, noto come "*burst ossidativo*", si accompagna ad un aumento della glicogenolisi, dell'ossidazione del glucosio mediante la via dello shunt dei pentoso fosfati e della produzione di metaboliti reattivi derivanti dalla riduzione dell'ossigeno. Il burst respiratorio non viene alterato da inibitori mitocondriali e quindi viene associato all'attivazione di meccanismi anaerobi.

#### *NADPH-ossidasi*

Il rapido consumo di ossigeno durante la fagocitosi di microrganismi è stato attribuito all'attivazione di una ossidasi, la NADPH-ossidasi, che utilizza il NADPH citosolico come fonte di elettroni e riduce l'ossigeno dando la formazione di anione superossido ( $O_2^-$ ).

E' proprio a causa dell'aumentato fabbisogno di NADPH che la cellula incrementa la velocità di degradazione del glucosio attraverso lo shunt dei pentoso fosfati (Kumar, 2005; Leto T.L 1999).

La NADPH-ossidasi è un complesso enzimatico multiproteico comprendente:

- **Flavocitocromo  $b_{245}$** : componente centrale dell'enzima, è un eterodimero transmembrana contenuto nei granuli secondari; è formato da una glicoproteina di 91 KDa ( $gp91^{phox}$ , dove  $phox$  sta per Phagocyte Oxidase) e da una proteina non glicosilata di 22 KDa ( $p22^{phox}$ ). La sua funzione è quella di trasportare gli elettroni all'ossigeno (Frank R. et al. 1996; Bernard M. Babior 1999).
- **Proteine citosoliche**:  $p47^{phox}$ , è una proteina di 47 KDa indispensabile per l'attività della NADPH-ossidasi in quanto responsabile del trasferimento di elettroni dal FAD all'eme centrale del citocromo  $b_{245}$ ;  $p67^{phox}$ , proteina di 67 KDa, associata nella

cellula a riposo ad una terza proteina del citosol **p40<sup>phox</sup>** di 40 KDa. Questa proteina, una volta attivata mediante fosforilazione, sembra avere un ruolo fondamentale nella traslocazione delle componenti citosoliche e nell'attivazione della NADPH-ossidasi, anche se il meccanismo non è ancora noto (Frank R. et al., 1996; Someya A. et al., 1999; Bernard M. Babior, 1999).

- **Rac2 e Rap1A**: proteine leganti il GTP appartenenti alla superfamiglia *ras*.

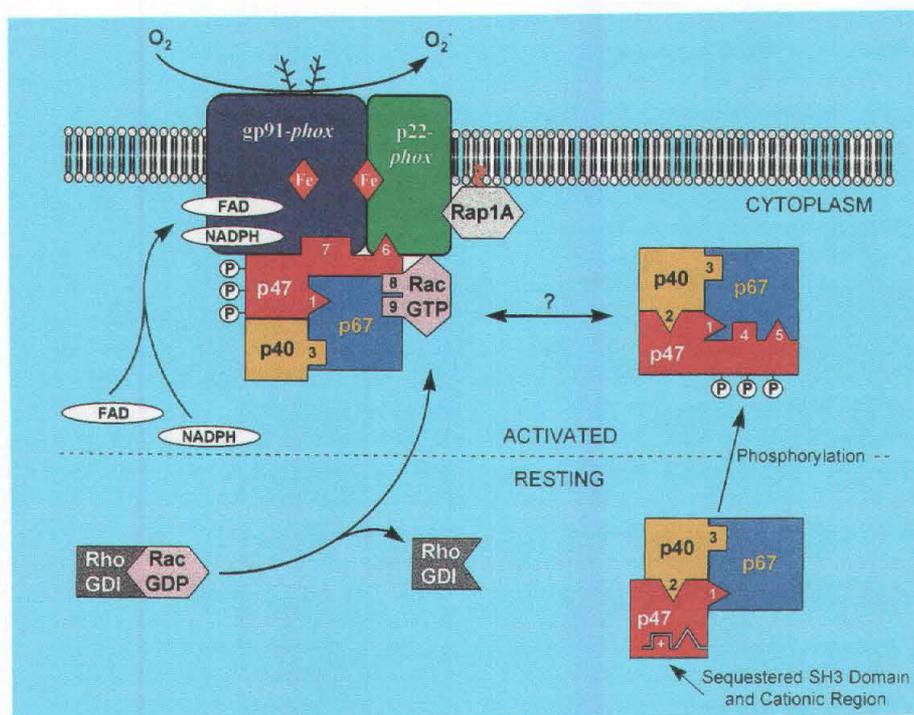


Figura 1.4 Attivazione della NADPH ossidasi

In condizioni di riposo, le componenti proteiche della NADPH-ossidasi sono localizzate nei compartimenti citoplasmatici e nella membrana plasmatica. Quando il PMN viene sottoposto a stimolazione, per esempio in seguito alla fagocitosi, ha luogo la degranulazione e il cit b<sub>245</sub> e la proteina Rap1A traslocano sulla membrana. Contemporaneamente la proteina Rac2, che nella cellula a riposo si trova nel citoplasma a formare un dimero con Rho-GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor), lega il GTP, si stacca da Rho-GDI e migra sulla membrana, legata al complesso formato da p40, p67 e da p47 solo dopo essere stata fosforilata e quindi attivata. Il legame di Rac2 a p47 fosforilata e alla gp91 garantisce l'assemblaggio definitivo della NADPH-ossidasi (Frank R. et al., 1996).

La NADPH-ossidasi può ora svolgere la sua funzione trasferendo gli elettroni dal NADPH all'ossigeno per formare anione superossido.

La reazione complessiva catalizzata dall'enzima è la seguente:



Il trasferimento dell'elettrone dall'NADPH all'ossigeno è un processo *multistep* durante il quale gli elettroni sono trasportati sequenzialmente attraverso varie componenti dell'ossidasi:



Sebbene il FAD e i due gruppi eme siano parte del centro redox dell'enzima, cioè del citocromo  $b_{558}$ , l'NADPH non si può legare a questa proteina prima del completo assemblaggio del complesso enzimatico durante l'attivazione.

Il superossido viene convertito in  $\text{H}_2\text{O}_2$  tramite la reazione di dismutazione che può essere sia spontanea sia mediata dall'enzima superossido dismutasi (SOD):

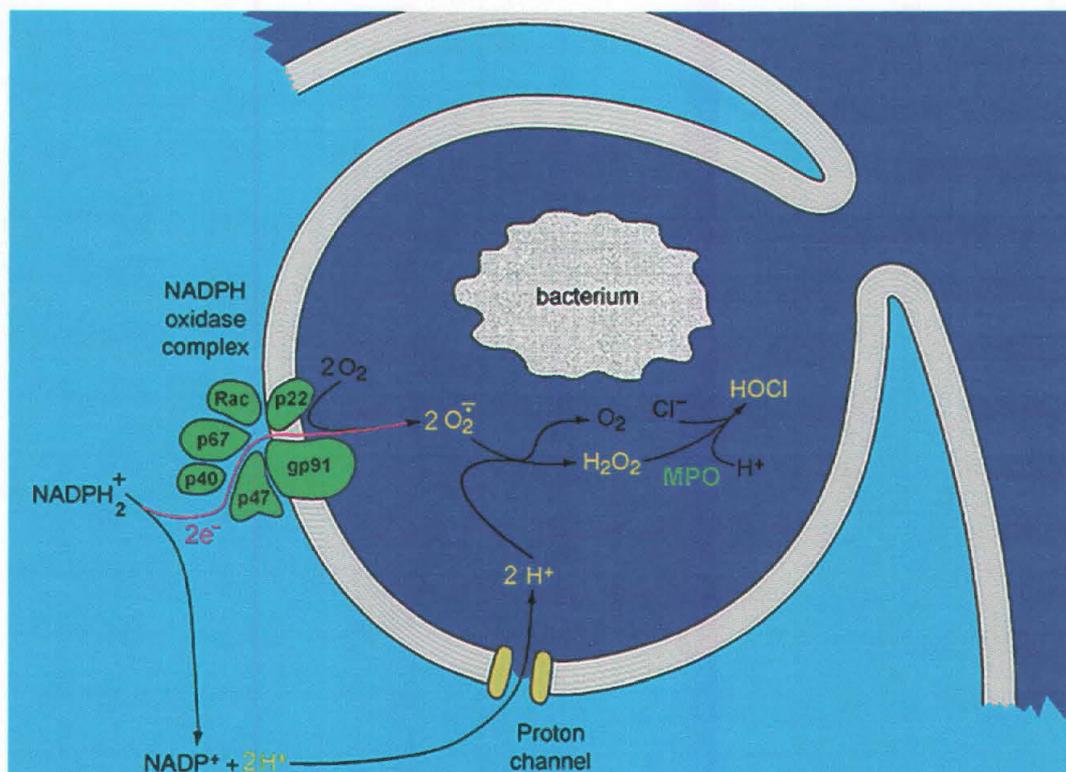
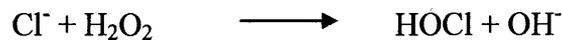


Figura 1.5 Meccanismi microbici ossigeno dipendenti

Anche il perossido di idrogeno è una specie tossica di per sé ma meno reattiva del superossido. Nel fagosoma però il suo effetto microbicida può venir enormemente

incrementato dall'attività di un secondo enzima, la mieloperossidasi (MPO) (Klebanoff S.J 1999).

La mieloperossidasi, enzima marker per i granuli azurofilari, in presenza di alogenuri, di cui il più comune è il  $\text{Cl}^-$ , converte il perossido di idrogeno in acido ipocloroso (HOCl), una specie chimica dotata di una notevole capacità battericida:



L'acido ipocloroso interagisce con la parete batterica, in particolare con i residui aminoacidici, formando cloramidi, molecole molto instabili che si trasformano in aldeidi. Le aldeidi formano legami crociati tra le proteine, creando fori nella parete del microorganismo. I radicali liberi  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$  e l'HOCl contribuiscono ad ampliare il danno della parete (Kumar et al., 2005; Klebanoff S.J., 1999).

#### 1.4.2 Meccanismi ossigeno-indipendenti

La fusione tra la membrana del fagosoma e i granuli azurofilari e specifici del PMN provoca il rilascio di proteine cationiche ad attività microbica nei confronti di batteri Gram +, Gram - e funghi. La maggior parte delle proteine ad attività citocida sono in grado di digerire strutture microbiche vitali. In generale, queste proteine agiscono in modo ottimale ad un pH lievemente alcalino. Questa condizione viene a crearsi nel fagosoma nelle prime fasi della fagocitosi; si è osservato infatti che il pH intrafagosomale subisce da prima una veloce alcalinizzazione, fino ad un valore di 7.8, e poi acidifica lentamente fino a valori di pH di 6-6.5 (Cech P. and R.I. Lehrer, 1984). Questa acidificazione ha un effetto batteriostatico e/o battericida per i microrganismi più sensibili e determina inoltre l'attivazione degli enzimi litici (idrolasi acide) liberati nel fagosoma dei granuli primari durante la degranolazione (Segal A.W. et al., 1981).

Le principali proteine microbicide, contenute nei granuli dei PMN, sono:

- **Lisozima:** presente sia nei granuli *primari* che *secondari*, è un enzima che ha come substrati i polimeri di peptidoglicani della parete dei batteri Gram + e la chitina dei funghi; la sua azione porta quindi ad alterazioni irreversibili della parete del microorganismo (Elsbach P. et al. 1999). L'azione battericida specifica del lisozima è generalmente limitata a batteri Gram + non patogeni e a funghi con una parete cellulare sensibile; tuttavia è stata documentata un'azione sinergica del lisozima con proteine che agiscono distruggendo la membrana esterna dei batteri Gram negativi,

che sarebbero altrimenti resistenti al lisozima. Alti livelli di resistenza a questo enzima sono inoltre propri di alcuni batteri Gram positivi caratterizzati da molti legami crociati e una grande complessità della matrice del peptidoglicano che impediscono l'accesso del lisozima al suo substrato.

- **Defensine:** proteine cationiche dei granuli *azurofili*, sono in grado di inserirsi a livello delle membrane dei microrganismi solo previa polimerizzazione. La funzione delle defensine è associata ad un incremento della permeabilità della parete, conseguente alla formazione di numerosi pori sulla superficie della stessa. L'azione citocida di questa molecola è rivolta soprattutto nei confronti di batteri Gram + e funghi. La resistenza nei confronti delle defensine che si manifesta in alcune classi batteriche è da attribuire all'alterazione di alcuni geni che regolano la struttura del lipolisaccaride (LPS). Alcune defensine, agendo in sinergia con un'altra proteina cationica, la BPI, con citotossicità specifica per i Gram negativi, aumentano così la propria attività citotossica. Alcuni studi suggeriscono che in seguito a un'interazione elettrostatica iniziale della BPI con i lipidi anionici di membrana, vi è l'inserzione delle defensine che permeabilizzano le membrane attraverso la formazione di pori multimerici. È stato dimostrato che le defensine hanno ulteriori effetti indipendenti dalla loro attività citotossica; in particolare, a concentrazioni nanomolari mostrano attività chemiotattica nei confronti delle cellule T, a concentrazioni micromolari riducono l'integrità di monolayer epiteliali; inoltre deprimono la fibrinolisi inibendo l'attivatore tissutale del plasminogeno (in vitro) (Elsbach P. et al., 1999).
- **BPI (Bactericidal/Permeability-increasing Protein):** è una proteina altamente cationica dei granuli *primari*, potente e selettivo agente citotossico nei confronti di batteri Gram -, in quanto presenta un'elevata affinità per LPS, principale componente della membrana esterna della parete batterica. La BPI si lega velocemente ed in modo serrato alla parete esterna, causando un aumento della permeabilità della stessa, favorendo l'attacco della PLA<sub>2</sub> ai fosfolipidi della membrana interna; provoca inoltre inibizione della crescita batterica (Elsbach P et al., 1999).
- **Serprocidine:** accumulate nei granuli *primari*, sono una famiglia di proteine omologhe alle serin-proteinasi ad attività microbica. Appartengono a questo gruppo la catepsina G, l'elastasi, l'azurocidina. La catepsina G è una proteina di piccole dimensioni che esplica la sua azione a livello della parete batterica, con un meccanismo non ancora ben noto, nel quale non sembra essere coinvolta una

componente enzimatica. L'*elastasi* è una glicoproteina cationica in grado di potenziare l'attività litica del lisozima, determinando la parziale degradazione della parete batterica; ciò permette alle altre molecole microbicide di penetrare nel batterio per digerirlo. L'*azurocidina* non presenta attività proteasica e si distingue dalle altre proteine microbicide in quanto agisce in modo ottimale ad un pH di 5.5 (Elsbach P. et al., 1999).

- **Fosfolipasi A<sub>2</sub>**: localizzata nei granuli *secondari* dei PMN, appartiene alla famiglia delle fosfolipasi A<sub>2</sub> secretorie (PLA<sub>2s</sub>) ed in particolare alla sottofamiglia del gruppo II. La PLA<sub>2</sub> del neutrofilo esercita una potente attività antibatterica nei confronti di batteri Gram + poiché è in grado di legarsi strettamente alla parete batterica con un meccanismo Ca<sup>2+</sup>-indipendente; una volta penetrata nel batterio, inizierà la degradazione dei fosfolipidi di membrana con un meccanismo Ca<sup>2+</sup>-dipendente. L'attività antibatterica della PLA<sub>2</sub> nei confronti di batteri Gram - è legata ad altri agenti microbici che alterano la membrana esterna, come ad esempio la BPI. Durante l'infiammazione i livelli dell'enzima mobilitato, sia localmente che in ambito sistemico, rendono conto di gran parte dell'attività battericida diretta contro vari tipi di Gram positivi (ad esempio lo *Staphylococcus aureus*) (Elsbach P. et al., 1999).
- **Catelicidine**: si ipotizza che queste proteine, localizzate nei granuli *secondari*, agiscano in sinergia con le defensine, determinando un incremento della permeabilizzazione sequenziale della membrana esterna ed interna dei microrganismi, che porta conseguentemente all'interruzione della sintesi dell'RNA e del DNA ed al blocco della respirazione cellulare (Elsbach P. et al., 1999; Nagaoka I. et al., 2000). La loro attività battericida è rivolta in particolare verso batteri Gram -. Questa famiglia di proteine battericide richiede un clivaggio proteolitico per essere attivata. Questo avverrebbe probabilmente durante la degranolazione nel vacuolo di fagocitosi, dove le catelicidine sono esposte a proteasi dei granuli azurofilari, in particolare all'*elastasi*. Il segmento liberato svolge la sua attività battericida legando fosfolipidi di membrana batterici, comprendenti anche endotossine, tramite la regione cationica C-terminale, e inserendosi nella membrana plasmatica tramite una regione altamente idrofobica.
- **Lattoferrina**: contenuta solamente nei granuli *secondari*, è una proteina dotata di attività batteriostatica, appartenente alla famiglia delle transferrine. La sua catena polipeptidica presenta due siti di legame per il ferro ferrico (Fe<sup>3+</sup>); la sua funzione è

legata alla capacità di sottrarre il ferro, molecola essenziale al batterio per la formazione di alcuni componenti cellulari come i citocromi e le catalasi. La lattoferrina presenta inoltre attività microbica nei confronti di batteri Gram + e Gram -, ma il meccanismo d'azione non è ancora ben definito. Si ipotizza che la lattoferrina complessata con il ferro possa facilitare la formazione di radicali idrossilici a partire da  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ , contribuendo in tal modo ai meccanismi  $O_2$ -dipendenti (Elsbach P. et al., 1999).

- **Calprotectine:** È un complesso di proteine anioniche leganti il calcio che rappresentano il 30-60% delle proteine citosoliche totali dei PMN. Sono presenti anche nei monociti, negli epitelii squamosi e nel plasma in condizioni di infiammazione. L'azione battericida contro batteri e funghi è neutralizzata dalla presenza di zinco ed è stata osservata contro *C. albicans* in assenza di contatto diretto, suggerendo che questa proteina agisca sottraendo zinco ai microrganismi. Queste proteine possono venir liberate all'esterno anche in seguito a lisi cellulare, conferendo attività antifungina ai fluidi presenti negli essudati purulenti (Elsbach P. et al., 1999).

## 1.5 Degranolazione

I PMN sono cellule secretorie che in risposta a vari tipi di stimoli rilasciano agenti microbicidi e proinfiammatori. Il rilascio dei diversi granuli citoplasmatici presenti nei PMN gioca un ruolo fondamentale nella biologia di queste cellule e partecipa alla regolazione di diverse funzioni dei neutrofilii nei processi infiammatori e nelle infezioni, come l'adesione, la diapedesi, la generazione di metaboliti reattivi dell'ossigeno ed il rilascio di enzimi litici. Come descritto in precedenza, i PMN presentano 4 tipi di granuli citoplasmatici: azurofilii o primari, specifici o secondari, terziari o gelatinasi-positivi e vescicole secretorie. Il rilascio di alcune popolazioni granulari può avvenire indipendentemente da quello di altre; infatti, uno stimolo secretorio non necessariamente induce il rilascio di tutti i tipi di granuli, ma il rilascio di ogni tipo di compartimento secretorio richiede che si verifichino condizioni particolari (Belen Martin-Martin et al., 2000).

Il rilascio di granuli a livello della membrana plasmatica vede coinvolti principalmente i granuli specifici (la cui membrana include varie molecole con possibile ruolo nella tras migrazione) accanto ai granuli contenenti gelatinasi e le vescicole secretorie; solo in condizioni particolari, anche gli azurofilo vengono mobilitati. E' noto inoltre che i granuli presentano un preciso ordine di secrezione; partendo dai più veloci, esso è: vescicole secretorie, granuli contenenti gelatinasi, granuli specifici, granuli azurofilo. Il significato funzionale di tale ordine non è solo la necessità di esporre recettori e molecole di adesione, ma anche di rendere disponibili enzimi, come collagenasi e gelatinasi, atti a digerire la membrana basale dell'endotelio, così da favorire la migrazione del granulocita (*Wright D.G. and Gallin, 1979; Sengelov H. et al., 1993; Witko-Sarsat V. et al., 2000*).

Mentre il rilascio dei granuli specifici favorisce la tras migrazione, è molto opportuno che durante questo processo la degranolazione degli azurofilo venga bloccata o comunque non favorita. Infatti, in questi organuli prevalgono fattori altamente citotossici che potrebbe arrecare grave danno alla cellule endoteliali (*Sengelov H. et al., 1993*).

Soltanto durante la fagocitosi i granuli azurofilo riversano il loro contenuto nel fagosoma contemporaneamente agli specifici. E' logico pensare che durante l'ingestione del microrganismo vengano annullati quei meccanismi che bloccano altrimenti la mobilitazione degli azurofilo. Comunque, durante la fagocitosi, una parte non trascurabile del contenuto dei granuli azurofilo può essere rilasciata all'esterno causando danno ai tessuti circostanti. Non è ancora noto se il rilascio di sostanze granulari verso l'interno e/o verso l'esterno della cellula siano due aspetti dello stesso fenomeno oppure se siano attuati e regolati da meccanismi diversi (*Henson P.M. et al., 1992; Fittschen C. and Henson P.M., 1994; Nath J., 1994*).

### ***1.5.1 Meccanismo di trasporto e fusione tra membrana e granuli***

Il trasporto di proteine all'interno della cellula, la loro distribuzione ai vari compartimenti e l'eventuale secrezione nell'ambiente extracellulare, richiedono la formazione di vescicole dall'ER e dall'apparato del Golgi, le quali si distaccano dal sito di origine per poi riconoscere e fondersi con il bersaglio (*Berton G., 1999*).

### **1.5.1a Il coinvolgimento del citoscheletro**

Diversi lavori dimostrano che il citoscheletro è coinvolto nel processo di degranulazione. Poste ed Allison (1973) per primi ipotizzarono l'esistenza di "una rete filamentosa" sotto alla membrana plasmatica, che impedisce l'accesso alla membrana stessa di granuli e vescicole. Questa ipotesi ottenne ulteriori conferme da successivi studi in cui l'utilizzo della citocalasina D, molecola in grado di depolimerizzare i filamenti di actina, determina in cellula stimulate un aumento del rilascio granulare. Anche nel processo di fagocitosi la presenza di polimeri di actina durante la formazione del fagosoma impediscono la fusione dei granuli al vacuolo: quando l'actina inizia a depolimerizzare la degranulazione può avvenire (Henson P. M., 1992).

Studi ultrastrutturali e funzionali sulla degranulazione dei PMN suggeriscono che i microtubuli hanno un ruolo nel trasporto intracellulare dei granuli in risposta a diversi tipi di stimoli (Rothwell, 1989; Belen Martin-Martin, 2000). In questo caso trattando le cellule con sostanze che bloccano la motilità dei microtubuli (es. colchicina, taxolo, nocodazolo) si evidenzia un diminuzione del rilascio granulare (Ryder, 1988; Hoffstein, 1977).

### **1.5.1b La fusione dei granuli alla membrana plasmatici**

Non si conosce ancora molto sui meccanismi di aggancio (dock) e di fusione tra i granuli citoplasmatici e la superficie cellulare nei PMN. La particolarità del meccanismo di fusione tra le vescicole secretorie (che hanno un origine endocitica) e la membrana plasmatica dei PMN è che si tratta di una fusione *eterotipica* che avviene cioè tra due distinti compartimenti di membrana. La fusione eterotipica coinvolge sia l'interazione tra proteine che permettono l'aggancio (dock) tra la vescicola e la loro destinazione finale, sia proteine che favoriscono l'interazione con i fosfolipidi del doppio strato lipidico della membrana delle vescicole ed il loro recettore di membrana. In aggiunta, componenti lipidiche della membrana partecipano alla regolazione del traffico di membrana e della degranulazione (Berton G., 1999).

Le proteine **SNARE** mediano il rilascio di vescicole secretorie in tutti gli organismi fin ora indagati, che vanno dai funghi all'uomo, portando allo sviluppo "dell'ipotesi di SNARE".

La SNARE (o recettore SNAP, dove SNAP sta per Solubile NSF Attachment Protein) è una proteina di membrana che forma un complesso con proteine solubili presenti nel citoplasma, rappresentate dal fattore N-etilmaleimide sensibile (NSF) e da SNAP, proteina che lega NSF.

In accordo con l'ipotesi di SNARE, l'aggancio delle vescicole secretorie alla membrana plasmatica è dovuto all'interazione tra **v-SNARE** (SNARE-vescicolari) e **t-SNARE** presenti sulla membrana plasmatica (SNARE-target), mediata dalla formazione del complesso con NSF e SNAP. Assieme ai recettori SNARE e alle proteine ad essi associate sono coinvolte nel trasporto vescicolare 2 membri distinti della famiglia delle proteine leganti il GTP: ARF, che interviene sia nella regolazione della gemmazione delle vescicole del Golgi sia nell'attivazione della degranulazione (in quanto in grado di attivare PLD che produce  $PIP_2$ ) e RAB che regola SNARE e altri traffici di membrana.

Un'altra classe di proteine coinvolte nella traslocazione delle vescicole sono le **annessine**, gruppo di proteine capaci di legare i fosfolipidi di membrana con meccanismo  $Ca^{2+}$ -dipendente: in presenza di  $Ca^{2+}$  le annessine legano i fosfolipidi acidi con alta affinità. Queste molecole hanno la capacità, polimerizzando, di formare un ponte e di avvicinare 2 membrane di strutture secretorie. Esse partecipano anche alla attivazione di canali ionici, all'infiammazione, alla proliferazione cellulare ed ad altre funzioni (Berton G., 1999, Belen Martin-Martin, 2000).

Per quanto riguarda lo studio delle componenti SNARE nei PMN i dati sono riassunti nella Tabella I (Logan M. R. et al., 2003):

Granuli	v-SNARE		t-SNARE
	R-SNARE	Q-SNARE	
Azurofili	VAMP-2	Non determinato	SNAP-23
Specifici	VAMP-2	SNAP-25,-23	Sintaxina 4
Vescicole secretorie	VAMP-2	SNAP-23	Sintaxina 6

Tabella I

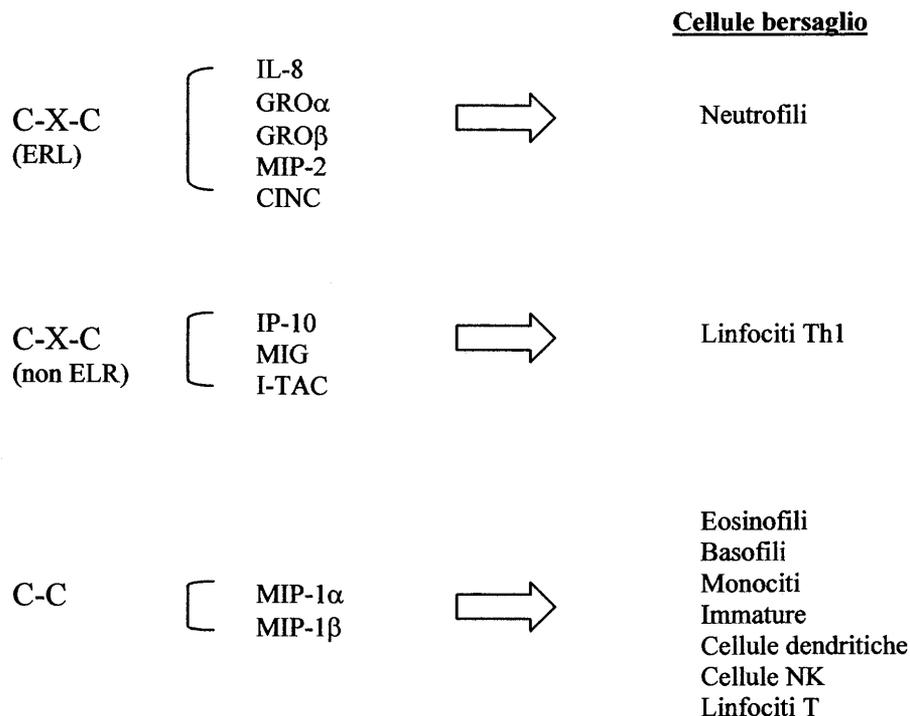
### ***1.5.2 Segnali e meccanismi di traduzione del segnale mediati da recettori che provocano la degranulazione***

A monte degli eventi di fusione tra granulo-membrana c'è l'innesco, da parte di diverse classi di recettori di membrana (7TMD, Integrine  $\beta_2$ , Fc $\gamma$ -R(s), L-selectine ecc.) di una complessa cascata di *segnali* che regolano tali eventi. Tra essi ricordiamo:

- attivazione della PLA<sub>2</sub> e della PLD e la conseguente modificazione dei fosfolipidi di membrana, con formazione di acido arachidonico, acido fosfatidico e PIP<sub>2</sub>;
- l'aumento di Ca<sup>2+</sup> e l'attivazione della proteinchinasi C (PKC) in seguito alla formazione di IP<sub>3</sub> e DAG dal fosfatidilinositolo;
- attivazione di membri della famiglia Rho;
- attivazione di IP<sub>3</sub>-chinasi;
- attivazione di PTK citoplasmatiche.

### ***1.6 Produzione e secrezione di chemochine***

I neutrofili ricoprono un ruolo cruciale nelle risposte infiammatorie grazie all'attivazioni di una serie di risposte effettrici da essi mediate che, complessivamente, rappresentano uno dei maggiori meccanismi di azione dell'immunità innata rivolta contro le infezioni e il danno tissutale. Negli ultimi anni ha iniziato a prendere forza l'ipotesi che il contributo dei PMN nella difesa contro l'ospite e nell'immunità innata non sia limitato al loro ruolo di fagociti professionali. I PMN, infatti, se stimolati sono in grado di esprimere numerosi geni i cui prodotti sono al centro delle risposte infiammatoria ed immunitaria. Questi prodotti genici includono non solo i recettori per Fc, componenti del complemento, sostanze microbicide cationiche e proteine della NADPH-ossidasi, ma anche diverse citochine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, VEGF), e chemochine (come IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , INF $\gamma$  ecc.). Poichè queste chemochine sono principalmente dei chemioattrattanti per i PMN, monociti, cellule dendritiche immature e linfociti T, emerge quindi che i PMN ricoprono un ruolo importante nel orchestrare il sequenziale reclutamento di distinte popolazioni leucocitarie nel sito di infezione o di danno tissutale.

**Chemochine prodotte dai PMN****Tabella II Chemochine prodotte dai PMN**

Le chemochine sono una famiglia di piccole proteine (8-14 KD) che agiscono principalmente come fattori chemiotattici specifici per i leucociti. Sono stati identificati circa 40 chemochine e 20 diversi recettori per la chemochine. In base alla disposizione dei primi due residui cisteina nelle loro sequenze primarie, le chemochine vengono classificate in due gruppi principali: C-X-C e C-C. Le chemochine C-X-C possono essere ulteriormente suddivise in due sottoclassi in base alla presenza di una sequenza glutamina-leucina-arginina (ELR) che precede i due residui cisteina. Le chemochine che presentano la sequenza ERL sono generalmente fattori chemiotattici per i neutrofilii ed hanno proprietà angiogenetiche (IL-8, GRO- $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , ENA-78, NAP-2 ecc.). Al contrario, le chemochine C-X-C che hanno perso la sequenza ELR (come IP-10, MIG e I-TAC), non sono in grado di attrarre i PMN ma attivano i linfociti T e mantengono la loro attività angiogenetica.

Recentemente sono state classificate altre due famiglie di chemochine: chemochine C, nelle quali mancano due dei quattro residui conservati di cisteina ( $\gamma$ -

chemochine), e CX<sub>3</sub>C, caratterizzate dalla presenza di tre aminoacidi tra le prime due cisteine.

Nonostante la diversità strutturale delle chemochine, i loro recettori sono rappresentati da recettori accoppiati a proteina G. Questi recettori (chiamati CXCR o CCR, per le chemochine C-X-C o C-C) in genere presentano specificità di legame sovrapponibili e i leucociti in genere esprimono più di un tipo di recettore.

Diversi studi in vitro ed in vivo dimostrano che i PMN, una volta migrati nel sito d'infezione vengono stimolati da agenti non eziologici a produrre chemochine che servono a reclutare diverse classi di leucociti durante le prime fasi dell'infezione. Infatti grazie alla produzione di IL-8, GRO- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IP-10, MIG, I-TAC ed altre chemochine, i PMN possono promuovere il reclutamento dei PMN stessi ed il conseguente accumulo ed attivazione di altri granulociti, monociti, macrofagi, cellule dendritiche immature e linfociti T (*Scapini P. et al., 2000*).

### ***1.7 Analisi dei movimenti di ioni inorganici nella regolazione della funzionalità leucocitaria***

Movimenti di svariate specie ioniche sono coinvolti nella fisiologia di molti tipi di cellule, inclusi i leucociti. E' stato dimostrato che, in queste cellule, flussi ionici possono svolgere un ruolo di messaggeri intracellulari fondamentali o di fattori di permissività e regolazione nella trasduzione dei segnali, intervenendo nell'accoppiamento stimolo-risposta. Accanto alla tradizionale dimensione biochimica della cellula emerge, quindi, quella che De Loof definisce la "dimensione elettrica" nella quale i flussi ionici e le correnti da essi generate, così come le cariche fisse, rivestono un'importanza sempre maggiore (*De Loof A, 1986*).

Analizzando il ruolo dei movimenti di ioni inorganici nei leucociti, risulta evidente come movimenti di Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, e Ca<sup>2+</sup> siano correlati a variazioni del potenziale di membrana, del pH intracellulare, del volume cellulare e ad oscillazioni del Ca<sup>2+</sup> citosolico, fenomeni, questi, spesso coinvolti in specifiche risposte funzionali dei leucociti stessi (*Simchowitz L., 1990; Shimizu Y. et al., 1993*).

### ***1.7.1 Coinvolgimento delle variazioni $Ca^{2+}$ intracellulare nella regolazione della funzionalità leucocitaria***

Il calcio svolge un ruolo importante nella regolazione della funzionalità dei PMN. Esso infatti è coinvolto nella regolazione di diverse funzioni come il rilascio di componenti granulari, la riorganizzazione del citoscheletro, la produzione di  $O_2^-$  e di altri eventi che regolano l'attivazione di queste cellule.

Nei PMN a riposo la  $[Ca^{2+}]_i$  è di 90-110 nM, mentre nelle cellule stimolate l'entità e la durata delle variazioni di  $Ca^{2+}_i$  dipendono dal tipo di stimolo e dalle vie di segnale ad esso correlate.

L'aumento di  $Ca^{2+}_i$ , indotto dallo stimolo, dipende sia dal rilascio di  $Ca^{2+}$  dagli stores intracellulari (evento precoce) sia dall'attivazione di  $Ca^{2+}$ -ATPasi e da canali per il  $Ca^{2+}$  presenti sulla membrana plasmatica (evento tardivo). Questo processo è finemente regolato poiché concentrazioni diverse di  $Ca^{2+}_i$ , indotte dallo stesso stimolo o da stimoli diversi, regolano funzioni diverse nella cellula. L'incremento di  $Ca^{2+}_i$  è infatti un fenomeno transiente regolato dalle pompe  $Ca^{2+}$ -ATPasiche localizzate sulla membrana plasmatica e sulla membrana degli stores intracellulari, le quali trasportano attivamente gli ioni  $Ca^{2+}$  dal citosol all'esterno della cellula e nel lume degli stores. La funzione degli stores intracellulari dipende sia dalle pompe ATPasiche, funzionalmente ed immunologicamente simili a quelle del reticolo sarcoplasmatico cardiaco, sia da un gruppo di proteine simili alla calsequestrina muscolare e da canali inositolo-3-fosfato sensibili presenti sulla superficie degli stores (*Krause and Lew, 1990*).

Sono stati individuati diversi stimoli che inducono incrementi nella concentrazione citosolica di calcio nei PMN, inclusi il cross-linking delle L-selectine e del CD11b/CD18 (CR3), l'fMLP, il PAF, i leucotrieni B4 e le  $\alpha$ -chemochine. Questi ligandi presentano come recettori specifici proteine appartenenti alla famiglia dei recettori seven-transmembran-domains (7TMD), accoppiati a proteine G.

L'attivazione dei recettori 7TMD determina, mediante le subunità attive delle proteine G, l'attivazione di PLC, la quale degrada  $PIP_2$  in  $IP_3$  e DAG. L' $IP_3$  è un messaggero intracellulare citoplasmatico che interagisce con il corrispondente recettore degli stores intracellulari causando la liberazione del  $Ca^{2+}$  immagazzinato e, quindi, l'innalzamento della concentrazione del  $Ca^{2+}$  intracellulare. Il calcio intracellulare oltre a promuovere diverse risposte cellulari, promuove l'ingresso di calcio extracellulare attraverso dei canali, detti store-operated channels (SOCs). L'aumento del calcio

intracellulare induce inoltre il trasferimento della PKC dal citosol alla membrana, ove viene attivata dal DAG (Berton G., 1999; Fraurschou M. and Borregard N., 2003; Bosanac I., 2004).

Il calcio è anche coinvolto nell'attivazione di diverse tirosin-chinasi e GTP-binding-protein (Ras family). E' stato dimostrato che le proteine Ras, assieme ad altra due componenti di questa superfamiglia, Rho e Rac, sono in grado di regolare diverse fenomeni funzionali dei PMN dipendenti dalla polimerizzazione dell'actina come la formazione di filopodi, l'adesione e la mobilità cellulare (Witko-Sarsat et al., 2000).

Anche il processo di fagocitosi, come noto, inizia con il contatto tra specifici recettori presenti sui fagociti e ligandi dei microrganismi. I recettori coinvolti sono il recettore per il C3b ed il recettore per la componente Fc delle IgG. L'interazione ligando-recettore attiva una serie di eventi cellulari e molecolari che coinvolgono il turnover del inositolfosfato con formazione di IP<sub>3</sub> e di DAG e conseguente aumento del Ca<sup>2+</sup> intracellulare, il quale, a sua volta regola la polimerizzazione dell'actina, la fagocitosi, la secrezione dei granuli, la produzione di metaboliti tossici del O<sub>2</sub> (Wilsson A. et al., 1996). Recentemente è stato dimostrato che questo aumento di Ca<sup>2+</sup> non è necessario per la l'uptake di particelle durante la fagocitosi in PMN e macrofagi, ma sembra essere importante nei successivi processi di fusione del fagolisosoma e attivazione dell'ossidasi (Lew D. P. et al., 1985; Di Virgilio et al., 1988; Lew D.P. et al., 1984; Jaconi M. E. E. et al., 1990; Theler J.-M. et al., 1995).

E' noto da tempo che il rilascio di sostanze granulari nei PMN è correlato al incremento di Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> e che esiste una precisa gerarchia nel rilascio dei diversi tipi di granuli in base alla concentrazione di Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> (Sengelow et al., 1993; Lew P.D et al. 1986): vescicole secretorie 140 nM; granuli gelatinasi positivi 250 nM; granuli secondari 300-550 nM; granuli primari 700-750 nM.



**Figura 1.6** Sequenza del rilascio dei granuli citoplasmatici in base al concentrazioni crescenti Ca<sup>2+</sup> intracellulare

### 1.7.2 Analisi del contenuto e dei movimenti di ioni cloruro nei PMN a riposo

Lo studio dei movimenti di ioni cloruro inizia tardivamente rispetto a quello di altre specie ioniche coinvolte nella regolazione della fisiologia cellulare ma in breve tempo si sviluppano diverse linee di ricerca atte ad identificare il ruolo di questo ione.

Vari dati di letteratura mettono in evidenza che i movimenti di ioni cloruro sono coinvolti in diversi aspetti della fisiologia di vari tipi di cellule, come la regolazione del potenziale di membrana, il controllo del pH e del volume cellulare (*Shimizu Y. et al., 1993*), la regolazione della secrezione epiteliale (*Collins F.S., 1992*) e la contrazione della muscolatura liscia (*Pacaud P. et al., 1991*).

I PMN sono caratterizzati da una concentrazione basale di ioni cloruro insolitamente elevata (*pari a 80-100 mM come descritto da Simchowiz L. et al., 1986; Ince C. et al., 1988*) se confrontata con quella descritta per la maggior parte delle cellule di mammifero (5-15 mM). Tra gli studi più importanti sulla caratterizzazione del contenuto intracellulare di  $\text{Cl}^-$  va ricordato in particolare quello condotto da Simchowiz e De Weer (1986). Gli autori, oltre ad aver misurato una concentrazione intracellulare di  $\text{Cl}^-$  pari a 60-90 mM, hanno dimostrato che il  $\text{Cl}^-$  non sia distribuito passivamente, secondo gradiente elettrochimico, ai due lati della membrana, ma che esistono meccanismi di accumulo intracellulare del  $\text{Cl}^-$ . Nello stesso lavoro troviamo inoltre una descrizione dettagliata dei movimenti di ioni cloruro in PMN a riposo e dei principali meccanismi che ne regolano il trasporto:

- **Scambiatore  $\text{Cl}^-/\text{Cl}^-$ :** è responsabile del 70% dei movimenti di  $\text{Cl}^-$  nei PMN a riposo; questo meccanismo è sensibile all'acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossi cinnamico (CHC), un inibitore competitivo per il trasporto di anioni. Lo scambiatore  $\text{Cl}^-/\text{Cl}^-$  presenta affinità elevata per il bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), trascurabile per il glucuronato e molto bassa per altri anioni non diffusibili come il gluconato ed il glutammato (*Simchowiz L., 1990*). Normalmente lo scambiatore scambia un  $\text{Cl}^-$  interno con uno esterno, ma in seguito a variazioni del pH intracellulare, provvede ad esportare ioni  $\text{HCO}_3^-$ , contribuendo alla normalizzazione del pH intracellulare.
- **Pompa per il  $\text{Cl}^-$  ATP-dipendente:** responsabile del 20% dei movimenti di  $\text{Cl}^-$  in ingresso. La sua funzione è di mantenere alta la concentrazione interna dell'anione.

L'utilizzo di un inibitore dell'approvvigionamento energetico derivante dalla glicolisi, il 2-desossi-D-glucosio (un analogo del glucosio non utilizzabile dalla cellula), mette in evidenza che, in queste condizioni sperimentali, la concentrazione di  $\text{Cl}^-$  scende fino a 20 mM, valore teorico della concentrazione dell'anione calcolato secondo l'equazione di Nernst. Questa pompa inoltre è sensibile all'azione inibente del CHC, dell'acido etacrinico (EA) e della furosemide, altri noti inibitori del trasporto di  $\text{Cl}^-$ .

- **Canali:** in presenza dell'inibitore CHC, che blocca i movimenti di  $\text{Cl}^-$  mediati sia dalla pompa che dallo scambiatore, si mettono in evidenza ulteriori meccanismi che regolano i movimenti dell'anione. Questi flussi avvengono secondo il gradiente elettrochimico, attraverso canali non ancora ben caratterizzati. I canali mediano il 30% del traffico di ioni  $\text{Cl}^-$  in uscita e l'8% di quello in entrata.

I canali per il  $\text{Cl}^-$  che sono stati caratterizzati nei PMN sono:

- **canali attivati dallo stiramento della membrana** (Simchowicz L. et al., 1993);
- **canali voltaggio-dipendenti**, regolati dalla protein-chinasi C (Schumman M.A. and Raffin A.T., 1994);
- **canali  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendenti, voltaggio-indipendenti** (Schumann M. A. et al., 1993);
- **canali  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendenti** (Krause K.H. et al., 1990);
- **canali glicina-dipendenti** (Wheler M. et al., 2000).

### **1.7.2a Analisi del contenuto e dei movimenti di ioni cloruro nei PMN nella regolazione della funzionalità leucocitaria**

Una prima evidenza sperimentale del ruolo svolto dall'anione nella funzionalità dei PMN mette in relazione una riduzione del contenuto intracellulare di  $\text{Cl}^-$ , indotta dal PMA nei PMN in sospensione, con la depolarizzazione della membrana plasmatica, indotta dallo stesso stimolo. Tuttavia i movimenti dell'anione non vengono correlati con funzioni effettrici quali l'attivazione metabolica e la degranolazione (Meyers J.B. et al., 1990).

In tempi successivi lo studio in “vitro” dei movimenti di ioni  $\text{Cl}^-$  nei PMN ha consentito di dimostrare il coinvolgimento di questo anione in diversi aspetti della funzionalità del neutrofilo: l'aumento del consumo di  $\text{O}_2$ ; l'aumento della fosforilazione di alcune proteine; l'aumento della polimerizzazione dell'actina (*Grinstein S. et al., 1992*); l'aumento del rilascio di componenti granulari (*Fittshenn C. et al., 1994*); lo spreading e l'attivazione metabolica indotta dal TNF (*Menegazzi R. et al., 1996*); lo spreading e l'attivazione metabolica indotta dal crosslinking delle integrine  $\beta_2$  (*Menegazzi R. et al., 1999*); modificazioni conformazionali delle integrine  $\beta_2$  (*Menegazzi R. et al., 2000*); variazioni del pH intracellulare (*Menegazzi R. et al., 1999*).

## 2. Scopo

Il progetto di ricerca che ho sviluppato durante il triennio del dottorato rientra nell'ambito di un vasto campo di attività sperimentale che da anni viene condotta nel laboratorio di Fisiopatologia dei Fagociti presso il Dipartimento di Fisiologia e Patologia dell'Università di Trieste. Tale attività è dedicata allo studio dei meccanismi molecolari coinvolti nell'attivazione di cellule della risposta immunitaria innata, quali i leucociti polimorfonucleati neutrofilo (PMN) e i macrofagi.

In particolare, l'attività sperimentale da me svolta rappresenta una prosecuzione di un filone di ricerca che studia il ruolo dei movimenti di cloruro nell'attivazione di specifiche funzioni dei PMN.

I principali obiettivi che mi sono proposti di raggiungere e che sono stati affrontati sperimentalmente in questa tesi si possono così riassumere:

- verificare se, analogamente a quanto già dimostrato per molti stimoli solubili, l'interazione dei PMN con stimoli particolati può innescare flussi di  $\text{Cl}^-$  che portino a modificazioni dell'elevato contenuto basale di questo anione;
- analizzare i flussi di  $\text{Cl}^-$  nei PMN fagocitanti microrganismi patogeni, in particolare *C. albicans*, allo scopo di definire la dipendenza di tali flussi dai principali eventi che regolano la fagocitosi, cioè il riconoscimento e l'ingestione;
- individuare l'esistenza di una possibile correlazione tra movimenti di cloruro e attività candidacida dei PMN, analizzando il ruolo dei flussi di questo anione nell'attivazione dei principali meccanismi microbicidi di questi fagociti;
- tentare di comprendere attraverso quali meccanismi i flussi di  $\text{Cl}^-$  possono intervenire nella regolazione delle risposte funzionali dei PMN, con particolare riferimento all'attivazione delle principali vie di segnalazione intracellulare coinvolte nel fenomeno della degranulazione.

Va ricordato che per poter affrontare questo lavoro di ricerca si è resa indispensabile la messa a punto di alcune metodiche che consentissero l'accurata e riproducibile valutazione delle risposte funzionali dei PMN da me studiate. In particolare, come risulterà evidente consultando la prima parte della sezione dei Risultati, parte dell'attività sperimentale è stata inizialmente dedicata alla realizzazione di un nuovo metodo di valutazione della fagocitosi (successivamente pubblicato; *Busetto S., Trevisan E. et al., 2004*) e al miglioramento di una tecnica citofluorimetrica per l'analisi  $\text{Cl}^-$  dell'attività candidacida dei PMN.

# 3. Materiali e Metodi

### **3.1 Isolamento di leucociti polimorfonucleati neutrofili da sangue umano periferico**

#### **Materiali**

**PBS** (Phosphate Buffered Saline) soluzione salina tamponata: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4.

**Percoll:** diluendo la sospensione madre di Percoll (densità 1.129 g/l) (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Svezia) con PBS 10 volte concentrato (3020-3050 mOsm) sterile e acqua sterile apirogena (Laboratori Diaco Biomedicali Spa, Trieste), si preparano le sospensioni di Percoll al 62% (densità 1.078 g/l) e di Percoll al 75% (densità 1.103 g/l).

**Soluzione anticoagulante:** etilendiaminotetracetato tetrasodico (Na<sub>4</sub>EDTA) 40 mM in PBS.

**Soluzione ipotonica:** tampone fosfato 0.1 mM, pH 7.4.

**Soluzione ipertonica:** 1.3% NaCl in tampone fosfato 0.1 mM, pH 7.4.

**Tampone Hepes:** 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM Hepes, 5 mM glucosio, pH 7.4, addizionato di BSA (Albumin, Bovine Fraction V Solution 30%; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) allo 0.2%.

**Tampone Hepes-ioni:** tampone Hepes contenente 1 mM CaCl<sub>2</sub> e 1 mM MgCl<sub>2</sub>.

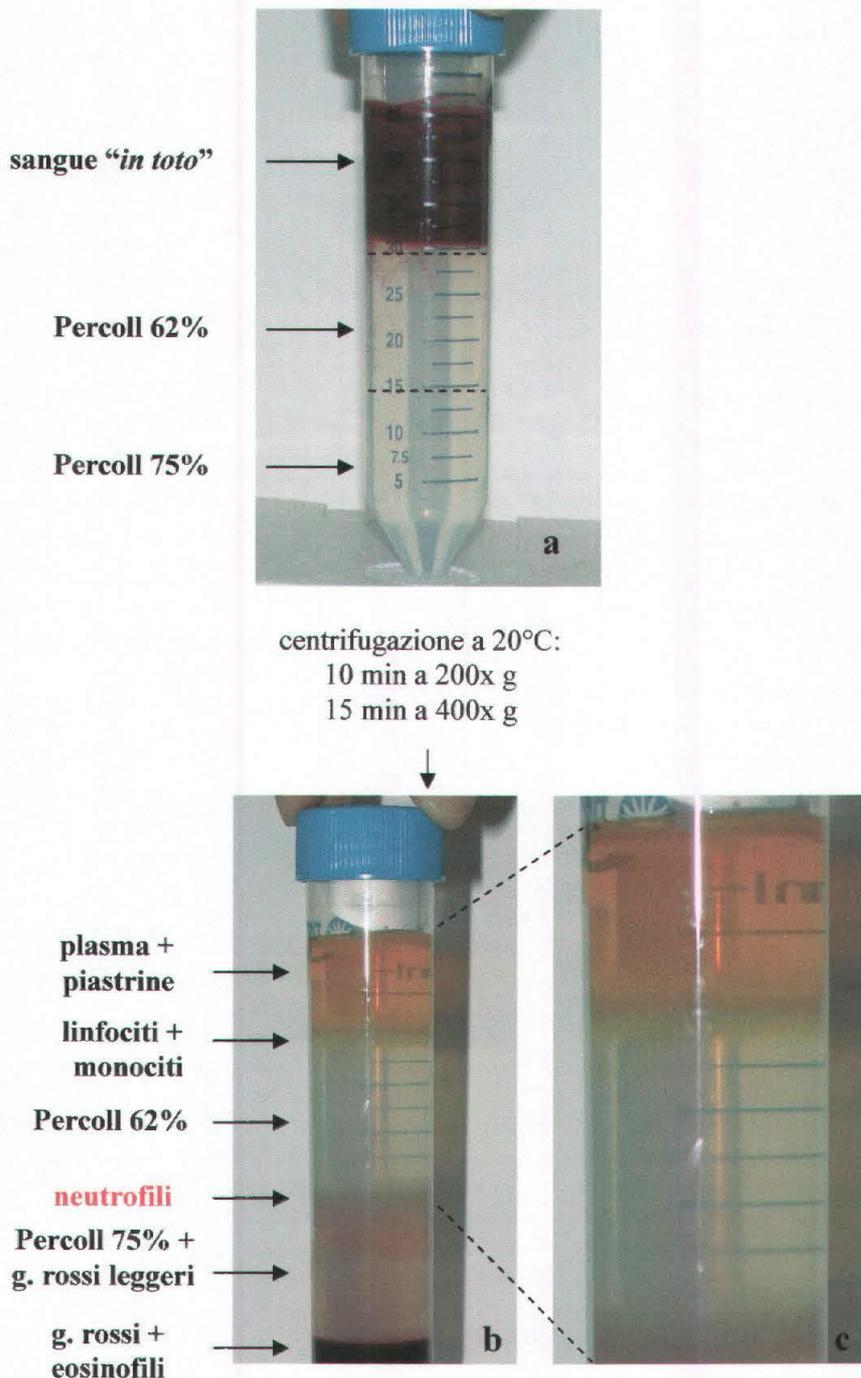
Le soluzioni sono state preparate utilizzando acqua apirogena sterile.

#### **Metodo [modificato da Metcalf et al. 1986]**

Il sangue umano periferico, prelevato da un donatore sano, viene posto in una provetta contenente la soluzione anticoagulante di Na<sub>4</sub>EDTA (concentrazione finale 4 mM). Viene quindi preparato un gradiente discontinuo di Percoll formato da 4 ml di Percoll 75% e da 4 ml di Percoll 62%, sul quale vengono stratificati 4 ml di sangue. La provetta viene centrifugata per 10 minuti a 200 x g e per 15 minuti a 400 x g alla temperatura di 20°C.

Al termine della centrifugazione le diverse componenti cellulari del sangue si trovano disposte nel gradiente, a seconda della loro densità, nel seguente modo: gli eritrociti e gli eosinofili sedimentano sul fondo della provetta, i granulociti neutrofili e

una piccola frazione degli eosinofili all'interfaccia fra il Percoll 75% e il Percoll 62%, i linfociti ed i monociti fra il Percoll 62% ed il plasma.



**Figura 3.1** Isolamento di leucociti polimorfonucleati neutrofil da sangue umano periferico. Il sangue, reso non coagulabile con Na<sub>4</sub>EDTA, viene stratificato su un gradiente discontinuo di Percoll 62% e 75% (pannello a). Dopo centrifugazione per i tempi e le velocità indicate, i componenti del sangue si distribuiscono nel seguente modo: il plasma e le piastrine nella parte più alta della provetta, linfociti e monociti tra il plasma ed il Percoll 62%, i neutrofil all'interfacie Percoll 62% e Percoll 75% e la maggior parte dei globuli rossi sul fondo della provetta (pannello b). Nel pannello c è mostrato un particolare.

Dopo aver rimosso il plasma e la banda dei linfo-monociti, i granulociti neutrofilii vengono raccolti in una provetta e diluiti in tampone HEPES. Si procede quindi al lavaggio del campione per centrifugazione a 250 x g per 7 minuti, sempre a 20°C.

Gli eritrociti in alcuni casi contaminano la preparazione dei neutrofilii; per eliminare questo problema il campione viene sottoposto a lisi ipotonica. Il fondello dei granulociti viene risospeso in 3 volumi di soluzione ipotonica per 10 secondi, ai quali si aggiungono successivamente 7 volumi di soluzione ipertonica per ripristinare l'isotonicità del mezzo. Le cellule vanno ulteriormente diluite in tampone HEPES e sottoposte ad un secondo lavaggio. Al termine della centrifugazione i neutrofilii vengono risospesi in un volume noto di tampone HEPES e contati con un contatore elettronico di particelle (Coulter Counter LTD, Luton, BEDS, England). La popolazione cellulare ottenuta è solitamente costituita dal 95%-97% di granulociti neutrofilii, dall'2-3% di granulociti eosinofilii, dall'1-2% di cellule mononucleate. La caratterizzazione viene fatta sulla base della conta differenziale dei citocentrifugati colorati con Dip Quick (Dyaset s.r.l., Portomaggiore, Ferrara). Poco prima di iniziare le prove funzionali vengono aggiunti alla sospensione di cellule  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgCl}_2$  alla concentrazione di 1 mM finale.

### ***3.2 Coltura ed opsonizzazione di particelle fagocitabili***

#### ***3.2.1 Coltura ed opsonizzazione di *Candida albicans****

##### ***Materiali***

***C. albicans***: ceppo ospedaliero isolato da un paziente e mantenuto a -80°C

***Soluzione fisiologica*** di NaCl 0.9% (Diacò)

***Brodo di coltura Sabouraud-destrosio*** (10 g/L di Bacto-peptone e 20 g/L di destrosio (Sigma))

***Pool di sieri umani***

***Siero scomplementato***

***Siero deprivato di anticorpi***

## **Metodo**

Un'aliquota di particelle fungine viene scongelata, risospesa in Sabouraud-destrosio e mantenuta in brodocoltura a 30°C per 20 ore in un bagnetto termostato in agitazione per permettere alle particelle fungine di crescere in ambiente ottimale. Al termine dell'incubazione le particelle vengono sottoposte a due lavaggi, centrifugandole a 2000 x g per 5 minuti, in abbondante soluzione fisiologica e risospese in un volume noto della stessa soluzione salina. A questo punto si procede con l'opsonizzazione, aggiungendo alla soluzione fisiologica contenente le candide il siero al 25% e ioni CaCl<sub>2</sub> e MgCl<sub>2</sub> ad una concentrazione finale di 1 mM. Il campione viene poi incubato per 30 minuti in agitazione a 37°C in bagnetto termostato. Al termine dell'incubazione si diluisce a volume il campione, si effettuano due lavaggi a 2000 x g per 5 minuti a 4°C e il pellet viene risospeso in un volume noto di NaCl 0.9% per procedere alla conta mediante contatore elettronico di particelle.

### **3.2.2. Coltura ed opsonizzazione di *Stafilococcus aureus***

#### **Materiali**

***Stafilococcus aureus***: ceppo 502 A, ATCC 27217, fornito dal dott. J. Iandolo (Department of Microbiology and Immunology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK, USA).

**LB (*Luria Bertani*) Broth, Miller, disidratato**: peptone 10 g/L, estratto di lievito 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH finale 7.0, a 25°C (Merk, Darmstadt, Germania). Il terreno di coltura viene ricostituito in acqua distillata (25 g/L) e autoclavato.

**Soluzione fisiologica** di NaCl 0.9% (Diaco)

**Pool di sieri umani**

#### **Metodo**

Singole colonie di batteri, conservati a 4°C in terreno LB-agar su piastra Petri, vengono inoculate in provetta contenente circa 7 ml di terreno LB liquido e fatte crescere per 20 ore a 37°C in un incubatore termostato. La brodocoltura viene quindi sottoposta a lavaggio in soluzione fisiologica mediante centrifugazione a 2000 x g per 7 minuti. Il

fondello ottenuto è risospeso in 1.5 ml di soluzione fisiologica, trasferito in provetta di tipo Eppendorf e centrifugato a 12000 x g per 10 secondi; il pellet viene infine risospeso in 1.5 ml di soluzione fisiologica.

La concentrazione della sospensione batterica viene stabilita mediante lettura spettrofotometrica della torbidità alla lunghezza d'onda di 500 nm (Spectrophotometer UV/VIS Perkin-Elmer, Lambda 5); il valore di densità ottica viene confrontato con una curva di taratura costruita sulla base di sospensioni batteriche la cui concentrazione è stata determinata attraverso conta delle colonie su piastra Petri.

In seguito i batteri vengono diluiti alla concentrazione desiderata in tampone HEPES-ioni e quindi opsonizzati con pool di sieri umani al 10%, per 30 minuti a 37°C in bagno termostato, in agitazione.

### ***3.2.3 Opsonizzazione dello Zimosan***

#### ***Materiali***

***Zimosan*** (Zimosan A, Sigma Chem. Co. USA)

***Soluzione fisiologica*** di NaCl 0.9% (Diac)

***Pool di sieri umani***

#### ***Metodo***

Lo Zimosan (parete cellulare del lievito) viene risospeso in soluzione fisiologica, bollito per 20 minuti a bagno maria, centrifugato a 2000 x g per 7 minuti e risospeso in soluzione fisiologica. Per l'opsonizzazione si aggiunge siero al 20% e si incuba per 37°C per 30 minuti in un bagno termostato in agitazione. Al termine dell'incubazione la sospensione viene diluita in NaCl 0.9% e centrifugata a 2000 x g per 7 minuti. Il pellet, contenente lo Zimosan opsonizzato, viene quindi risospeso in tampone HEPES-ioni alla concentrazione di 10 mg/ml.

### 3.3 Marcatura di *C. albicans* con 5-(6)-carbossifluoresceina succinimidil estere [5-(6)-FAM-SE]

#### Materiali

**Tampone bicarbonato** 0.1 mM a pH 8.3

**Tampone glicina** 50 mM in fisiologica, pH 8.5

**Sonda:** 5-(e 6)-carbossifluoresceina succinimidil estere (5-(6)-FAM-SE) (Molecular Probes, Eugene, OR) conservata al buio, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , disciolto in DMSO ad una concentrazione di 20 mg/ml.

**Blastospore di *Candida albicans***

**Metodo** [Busetto S., Trevisan E. et al., 2004]

Disporre di particelle di *C. albicans* marcate con il fluorocromo è un prerequisito per la valutazione della fagocitosi tramite citofluorimetria.

Le particelle di *C. albicans*, dopo essere state coltivate over night e lavate due volte in NaCl, vengono risospese nella stessa soluzione fisiologica e uccise al calore tramite bollitura per 10 minuti. A questo punto le particelle fungine vengono rilavate, risospese in un volume noto della stessa soluzione e opsonizzate. La scelta di far precedere l'opsonizzazione alla marcatura deriva dall'osservazione riportata in letteratura (Busetto S., et al., 2004) in cui si evidenzia come particelle di *C. albicans* opsonizzate dopo la marcatura vengano riconosciute meno efficientemente dai PMN.

Una spiegazione al fenomeno viene data prendendo in considerazione il tipo di legame tra il fluoroforo e la parete di *C. albicans*. I gruppi succinimidil estere di 5-(6)-FAM-SE legano sulla parete di *C. albicans* gruppi amminici formando legami amidici stabili. Poiché gli stessi gruppi costituiscono i siti di legame per l'opsonina C3b del complemento, la sonda interferirebbe con l'opsonizzazione delle particelle. Si procede poi alla marcatura: le candide vengono lavate in tampone bicarbonato 0.1 M (pH 8.3) alla concentrazione di circa  $300 \times 10^6$  particelle/ml. Viene poi aggiunta la sonda fluorescente precedentemente diluita nel medesimo tampone ad una concentrazione finale di 1.5  $\mu\text{g/ml}$ . La sospensione di candide viene quindi messa ad incubare per 30 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$  al buio in agitazione; allo scadere della mezz'ora, il campione viene diluito

1:1 con glicina (50 mM, pH 8.5) per bloccare la reazione di coniugazione della sonda, ed incubato per ulteriori 30 minuti a 4°C. Terminata l'incubazione, le particelle vengono lavate due volte a 2000 x g per 5 minuti in fisiologica per eliminare ogni traccia della sonda non legata, risospese in fisiologica e conservate al buio a - 20°C. La marcatura delle particelle viene controllata di volta in volta analizzando il campione al citofluorimetro a flusso (FACSCalibur, Becton Dickinson).

### ***3.4 Valutazione dell'uccisione di C. albicans mediante conta delle unità formanti colonie (UFC)***

#### ***Materiali***

***Sabouraud-destrosio-agar*** (10 g/L bactopectone, 40 g/L destrosio, 15 g/L agar, pH 5.6) (ICN Biomedicals, Inc., Ohio, USA)

***Capsule Petri*** sterili

***Blastospore di C. albicans*** coltivate ed opsonizzate secondo la procedura descritta nel paragrafo 3.2.1 di Materiali e Metodi.

#### ***Metodo***

I campioni prelevati dagli stessi lisati delle prove utilizzate per la misura dell'attività candidacida tramite citofluorimetria, come descritto nel paragrafo 4.2, vengono diluiti in fisiologica e seminati in capsule Petri contenenti Sabouraud-destrosio-agar, in modo da piastrare circa 200-300 candide per capsula. Dopo 48 ore di incubazione a 30°C, si procede con la conta delle UFC. Le percentuali di uccisione sono ottenute applicando la seguente formula:

$$\% \text{ uccisione} = [1 - (\text{UFC tempo}_x \text{ di incubazione} - \text{UFC tempo}_0 \text{ di incubazione})] \times 100.$$

### 3.5 Valutazione della produzione di $O_2^-$

#### Materiali

**Citocromo c** di tipo VI da cuore di cavallo (Sigma).

**Micropiastre** di polistirene da 96 pozzetti a fondo piatto (Maxisorp, Nunc, Roskild, Danimarca)

#### Metodo

L'attivazione del metabolismo ossidativo viene valutata misurando la produzione di anione superossido ( $O_2^-$ ) dei PMN stimolati dalla presenza di *C. albicans* nel saggio. La misura viene condotta spettrofotometricamente valutando la quantità di citocromo c ridotta dall'anione seguendo il metodo descritto da *Dri et al. 1991*.

I PMN vengono diluiti in tampone Hepes-ioni alla concentrazione di  $5 \times 10^6$  PMN/ml in provette di poli[HEMA]. Ai campioni viene aggiunto il citocromo c (0.18 mM finale) e le *C. albicans*, sempre in rapporto di 3:1 con i PMN; le provette vengono quindi messe ad incubare per 30 minuti a 37°C in agitazione. Allo scadere del tempo di incubazione i campioni vengono trasferiti in Eppendorf e centrifugati a 400 g per 4 minuti. Dei sovranatanti ottenuti, 100-150  $\mu$ l vengono posti nei pozzetti di una micropiastre per la lettura. La piastra viene messa in un lettore per micropiastre (Power Wave X, Bio-Tek Instruments, Inc.) e le letture vengono effettuate alla lunghezza d'onda di 550 nm e 540 nm.

Considerando che:

- una mole di  $O_2^-$  riduce una mole di citocromo c;
- la differenza tra i valori di assorbanza letti a 550 nm (lunghezza d'onda del picco di assorbimento del citocromo c ridotto) e quelli letti a 540 nm (lunghezza d'onda del punto isosbestico degli spettri di assorbimento del citocromo c ridotto e ossidato) è proporzionale alla quantità di citocromo c ridotto dall'anione;
- in questo sistema di lettura 1 nmole di citocromo c ridotto corrisponde ad una differenza di densità ottica tra 550 nm e 540 nm di 0.037

la quantità di  $O_2^-$  prodotta da  $10^6$  PMN viene calcolata come segue:

$$\text{nmoli } O_2^- / 10^6 \text{ PMN} = \frac{\text{D.O.} \times 10^6}{0.037 \times n}$$

dove n è il numero delle cellule del campione in esame.

### ***3.6 Valutazione del metabolismo ossidativo in citofluorimetria a flusso***

#### ***Materiali***

***Diidrorodamina 123*** (DHR) (Sigma) sciolta alla concentrazione di 10 mM in N,N-dimetilformamide (DMF) e conservata a  $-20^\circ\text{C}$  (al momento dell'uso viene diluita in tampone Hepes)

***Metodo*** [Vowells S.J., 1995; Emmendörffer, 1990]

Per valutare il metabolismo ossidativo in citofluorimetria abbiamo utilizzato una sonda, la diidrorodamina 123 (DHR), un composto che diffonde liberamente nei PMN, andandosi a localizzare nei mitocondri. In seguito all'attivazione metabolica, gli intermedi reattivi dell'ossigeno prodotti, in particolare l' $H_2O_2$ , ossidano la sonda trasformandola nel composto rodamina 123 (Rho 123), che fluoresce nel verde se eccitato a 488 nm.

I PMN vengono incubati con la sonda DHR (1  $\mu\text{M}$  finale) per 5' a  $37^\circ\text{C}$  per consentirne il caricamento; successivamente vengono incubati a  $37^\circ\text{C}$  per i tempi previsti con i diversi stimoli. Al termine del periodo d'incubazione le prove vengono bloccate ponendo i campioni in ghiaccio. Si prosegue quindi con le letture al citofluorimetro. Le cellule metabolicamente attivate, contenenti quindi la sonda ossidata, danno un picco di fluorescenza verde (FL-1 530  $\pm$  30 nm); i PMN che non hanno risposto appaiono come eventi caratterizzati da una fluorescenza sensibilmente più bassa.

### **3.7 Degranolazione dei PMN sottoposti a stimoli di vario tipo**

I sovrinatanti utilizzati derivano dalla centrifugazione di campioni di PMN precedentemente sottoposti ad incubazione con stimoli particolati o solubili (*C. albicans*, fMLP) durante prove funzionali di varia tipologia (fagocitosi, uccisione, efflussi di cloruro etc).

#### **3.7.1 Dosaggio della mieloperossidasi (MPO)**

##### **Materiali**

**Tampone acetato** 20 mM, pH 5.5, addizionato di 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) 2 mM (Serva) e di cetiltrimetilammonio bromuro (CTAB) allo 0.1% in peso (Eastman Kodak Co, Rochester, N.Y., USA)

**Soluzione di  $H_2O_2$**  0.7 mM in acqua distillata (Merck, Darmstadt, Germania)

**Soluzione di  $H_2SO_4$**  2 N in acqua distillata (Merck, Darmstadt, Germania)

##### **Metodo**

Il rilascio della mieloperossidasi, enzima marker dei granuli azurofilari, è stato valutato utilizzando il metodo descritto da *Menegazzi et al. (1992)*.

Si procede ponendo 75  $\mu$ l dei sovrinatanti e 75  $\mu$ l di tampone acetato addizionato di TMB e CTAB nei pozzetti di una micropiastra dove verrà sviluppato un saggio colorimetrico quantitativo che misura l'ossidazione del substrato TMB ad opera dell'enzima MPO in presenza di  $H_2O_2$ . La reazione di ossidazione del TMB viene fatta partire aggiungendo contemporaneamente nei singoli pozzetti 75  $\mu$ l di  $H_2O_2$ ; dopo circa 1 minuto la reazione viene bloccata aggiungendo 100  $\mu$ l di  $H_2SO_4$  2 N. La piastra viene posta in un lettore per micropiastre dove le letture vengono fatte ad una lunghezza d'onda di 405 nm. Il valore ottenuto è una densità ottica ed è direttamente proporzionale alla mieloperossidasi rilasciata dalle cellule.

### 3.7.2 Dosaggio dell'elastasi

#### Materiali

**Tampone A:** Tris-HCl 0.1 M pH 7.5 addizionato di CaCl<sub>2</sub> 10 mM, 0.5 M di NaCl e 40% di DMSO

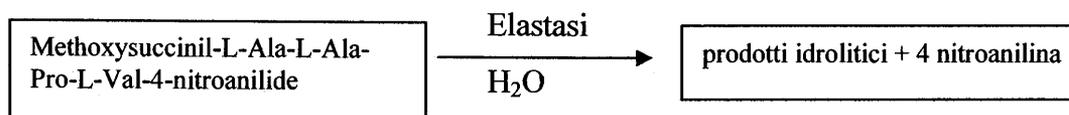
**Substrato:** Methoxysuccinil-L-Ala-L-Ala-Pro-L-Val-4-nitroanilide preparato alla concentrazione di 1 mg/ml in DMSO

**Standard:** Elastasi porcina-preparata 1 mg/ml nel tampone A e poi diluita 50x (20 µg/ml)

#### Metodo [Bergmeyer H.U., 1981]

Il rilascio di elastasi, enzima marker dei granuli azurofili, è stato valutato utilizzando un saggio colorimetrico quantitativo, condotto in piastra.

Si procede ponendo 30 µl del campione, 270 µl del tampone A e 18 µl di substrato nei pozzetti di una micropiastra, dove verrà sviluppato il saggio colorimetrico quantitativo che misura la quantità di 4-nitroanilide rilasciata dopo l'idrolisi del substrato ad opera dell'enzima elastasi in presenza di H<sub>2</sub>O. Perchè si sviluppi la reazione la piastra viene incubata overnight a 37°C. A fine incubazione la piastra viene posta in un lettore per micropiastre dove le letture vengono fatte ad una lunghezza d'onda di 405 nm. Il valore di densità ottica ottenuto è direttamente proporzionale all'enzima rilasciato.



### 3.7.3 Dosaggio della β-glucuronidasi

#### Materiali

**Tampone acetato 0.2 M** pH 5.0

**Substrato:** Fenoftaleingluconide 10 mM in H<sub>2</sub>O

**Blocco:** Tampone glicina 1 M pH 10.5

**Soluzione di Fenolftaleina Standard**

**Metodo** [Bergmeyer H.U., 1981]

Il rilascio di  $\beta$ -glucuronidasi, enzima marker dei granuli azurofili, è stato valutato utilizzando un saggio colorimetrico quantitativo, condotto in piastra.

Si procede ponendo 100  $\mu$ l del campione, 90  $\mu$ l di tampone acetato e 10  $\mu$ l di substrato nei pozzetti di una micropiastra, dove verrà sviluppato il saggio colorimetrico quantitativo che misura la quantità di fenolftaleina rilasciata dopo l'idrolisi del substrato ad opera dell'enzima  $\beta$ -glucuronidasi. Perché si sviluppi la reazione la piastra viene incubata overnight a 37°C. A fine incubazione si procede al blocco della reazione con 50  $\mu$ l di tampone glicina. Solo dopo il blocco il saggio si colora e quindi la piastra viene posta in un lettore per micropiastre dove le letture vengono fatte ad una lunghezza d'onda di 550 nm. Il valore ottenuto è una densità ottica ed è direttamente proporzionale all'enzima rilasciato. La quantità di fenolftaleina liberata viene confrontata con gli opportuni standard.

### **3.7.4 Immobilizzazione di anticorpi su piastre derivatizzate con idrazide**

#### **Materiali**

**Micropiastre da 96 pozzetti derivatizzate con idrazide (HZ)** (Costar Corp., Cambridge, MA)

**Periodato di sodio** NaIO<sub>4</sub> 2.5 mM sciolto in tampone acetato 10 mM pH 4.0.

**PBS** (Sigma)

**PBS** addizionato di BSA 0.1% (Sigma) e Tween 20 allo 0.1% (Merk, Darmstadt, Germania)

**Tampone Tris-HCl** 10 mM, pH 8.8

**Anticorpi** (es.  $\alpha$ -lattoferrina)

**Metodo [Brillhart K.L., 1991]**

L'utilizzo di piastre derivatizzate con idrazide (HZ) ha consentito di ottenere l'immobilizzazione orientata degli anticorpi (Ab) alla plastica dei pozzetti. La procedura per ottenere tali legami a siti specifici è di semplice applicazione: è infatti possibile legare covalentemente gli Ab all'idrazide attraverso la loro porzione Fc incrementando in tal modo, il numero di porzioni Fab disponibili per legare il ligando. Per potersi legare all'idrazide la porzione Fc deve subire una sorta di attivazione ovvero gli zuccheri presenti in tali porzioni del Ab devono venir ossidati. Questa reazione viene ottenuta incubando gli anticorpi in presenza di un agente ossidante, quale il periodato di sodio ( $\text{NaIO}_4$ ), il quale induce l'ossidazione dei due gruppi OH vicini appartenenti agli zuccheri, portando alla formazione di un dialdeide. E' proprio quest'ultima che, reagendo con i gruppi amminici delle molecole di idrazide, porta al legame covalente degli anticorpi con il substrato, originando così dei composti stabili (basi di Schiff). Gli Ab vengono incubati in tampone acetato contenente l'agente ossidante  $\text{NaIO}_4$  alla concentrazione finale di 10  $\mu\text{g/ml}$  per 30 minuti a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, vengono dispensati in ogni pozzetto della micropiastre 50  $\mu\text{l}$  della soluzione e lasciati ad incubare per 1 ora sempre a temperatura ambiente, ciò per consentire il legame covalente degli anticorpi "attivati" all'idrazide ("coupling").

Vengono quindi effettuati un lavaggio con PBS-Tween-BSA e successivamente 3 lavaggi con PBS; fatto ciò, ogni pozzetto viene caricato con 50  $\mu\text{l}$  di tampone Tris-HCl con BSA 1%, che viene lasciato agire per 1 ora, allo scopo di neutralizzare i rimanenti siti attivi della superficie ("quenching"). La micropiastre viene infine lavata 3 volte con PBS e 1 con PBS-Tween-BSA e preparata per le prove richieste.

**3.7.5 Dosaggio della lattoferrina****Materiali**

**PBS** (Sigma)

**PBS** addizionato di BSA 0.1% (Sigma) e Tween 20 allo 0.1% (Merk, Darmstadt, Germania)

**Anticorpo policlonale di coniglio anti-lattoferrina umana** (Sigma)

**Anticorpo policlonale di coniglio anti-lattoferrina umana biotinilato** (Sigma)

**Streptavidina-PO** (Sigma)

**Tampone acetato** 20 mM, pH 5.5, addizionato di 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) 2 mM (Serva) e di cetiltrimetilammonio bromuro (CTAB) allo 0.1% in peso (Eastman Kodak Co, Rochester, N. Y., USA)

**Soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** 0.7 mM in acqua distillata (Merck, Darmstadt, Germania)

**Soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** 2 N in acqua distillata (Merck, Darmstadt, Germania)

**Micropiastre da 96 pozzetti derivatizzate con idrazide (HZ)** (Costar Corp., Cambridge, MA)

**Metodo**

Con questa tecnica si vuole compiere una valutazione del rilascio di lattoferrina, enzima marker dei granuli specifici, da parte dei PMN a riposo o stimolati. Il dosaggio avviene mediante un saggio colorimetrico quantitativo. Per tale valutazione viene usata una micropiastre di idrazide allestita con Ab policlonali di coniglio anti-lattoferrina secondo il protocollo descritto nel paragrafo precedente. I sovranatanti da analizzare derivano da prove funzionali di diverso tipo (ed indotte da diversi stimoli) in cui tutti i campioni sono stati sottoposti a centrifugazione ed i sovranatanti diluiti 300x in PBS-Tween-BSA. Dei sovranatanti vengono piastrati 50 µl in ogni pozzetto e la piastra viene lasciata incubare per 45 minuti a temperatura ambiente prima di proseguire con i lavaggi (3 con PBS ed uno con PBS-Tween-BSA). Si procede poi con l'aggiunta degli Ab α-lattoferrina biotinilati (diluiti in PBS-Tween-BSA 1000x) ed un'ulteriore incubazione di 45 minuti a temperatura ambiente. Dopo le procedure di lavaggio si effettua l'ultima incubazione con la streptavidina-PO (diluita in PBS-Tween-BSA 1000x), per 45 minuti. Dopo l'ultima serie di lavaggi, si procede con la reazione perossidasi mediante l'aggiunta di 75 µl di tampone acetato contenente TMB e CTAB. La reazione viene fatta partire aggiungendo contemporaneamente nei singoli pozzetti 75 µl di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e bloccata, dopo circa un minuto con l'aggiunta di 100 µl di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La piastra viene in fine posta in un lettore per micropiastre dove si effettua una lettura ad una lunghezza d'onda di 405 nm. Il valore ottenuto è una densità ottica ed è direttamente proporzionale alla lattoferrina presente.

### **3.8 Dosaggio della lattico deidrogenasi**

#### **Materiali**

**Tampone Na-fosfato** 0.1 M pH 7.4

**Piruvato di sodio** 0.64 mM sciolto in tampone fosfato

**Triton X-100**

**NADH** 8 mM sciolto in H<sub>2</sub>O

**Tris-HCl** 10 mM, pH 7.4

**Metodo** [Bergmeyer H.U., 1981]

Il saggio è stato utilizzato per la valutazione delle variazioni della permeabilità della membrana cellulare eventualmente indotte dalle sostanze utilizzate nelle varie prove di funzionalità. Il test viene allestito in piastra, ponendo in ogni pozzetto la miscela di reazione costituita da 100 µl di tampone Na-fosfato 0.1 M, pH 7.4, contenente piruvato 0.64 mM e Triton X-100 0.05% finale. Dopo l'aggiunta dei campioni, provenienti dalle diverse prove, la reazione viene fatta partire aggiungendo 50 µl dello starter (NADH 0.544mM preparato in Tris-HCl 10 mM, pH 7.4). L'ossidazione del NADH viene seguita in cinetica a 340 nm in un lettore per micropiastre.

### **3.9 Valutazione degli efflussi e del contenuto intracellulare di Cl<sup>-</sup> nei PMN**

#### **Materiali**

- Na<sup>36</sup>Cl, attività specifica 14 µCi/g Cl<sup>-</sup> (Amersham Biosciences Europe GmbH)

#### **3.9.1 Valutazione degli efflussi di <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> indotti da vari stimoli**

La valutazione degli efflussi di Cl<sup>-</sup> viene effettuata seguendo i movimenti di <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> in granulociti neutrofili precedentemente caricati con il radioisotopo, secondo il protocollo

descritto da *Simchowitz e De Weer 1986*.

Per il caricamento, le cellule, risospese in tampone Hepes alla concentrazione di  $10\text{-}20 \times 10^6$  PMN/ml, vengono incubate con  $^{36}\text{Cl}^-$  ( $3.0 \mu\text{Ci/ml}$ ) per 2 ore a  $37^\circ\text{C}$  in agitazione, in provette di poli(2-idrossietilmetacrilato) (poli[HEMA]) per evitare l'adesione delle cellule alle pareti del contenitore. Al termine dell'incubazione, quando il radioisotopo ha raggiunto l'equilibrio tra i compartimenti intracellulare ed extracellulare, il campione viene lavato due volte in tampone Hepes preriscaldato a  $37^\circ\text{C}$  per rimuovere il  $^{36}\text{Cl}^-$  extracellulare e quindi risospeso nello stesso tampone addizionato di  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{CaCl}_2$  1 mM.

La valutazione degli efflussi di  $^{36}\text{Cl}^-$  viene effettuata incubando i PMN a  $5 \times 10^6/\text{ml}$  in agitazione in provette di poli[HEMA] a  $37^\circ\text{C}$  in assenza o in presenza di vari stimoli (*C. albicans*, fMLP) per i tempi prestabiliti. A fine incubazione, 400  $\mu\text{l}$  di sospensione cellulare vengono trasferiti e centrifugati in Eppendorf a  $400 \times g$  per 4 minuti. Successivamente i sovranatanti vengono diluiti in 5 ml di liquido di scintillazione per la conta della radioattività ad essi associata, realizzata utilizzando un  $\beta$  counter (LS 6000 TA, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA).

La valutazione percentuale degli efflussi viene calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\text{Efflussi } \text{Cl}^- = \frac{[(\text{cpm nel sovranatante al tempo}_x \text{ di incubazione}) - (\text{cpm nel sovranatante al tempo}_0 \text{ di incubazione})]}{[(\text{cpm totali nella sospensione cellulare}) - (\text{cpm nel sovranatante al tempo}_0 \text{ di incubazione})]} \times 100$$

### 3.9.2 Valutazione delle variazioni del contenuto intracellulare di $^{36}\text{Cl}$ ( $^{36}\text{Cl}_i$ ) indotte da *C. albicans*

#### Materiali

**Miscela di olio di paraffina e olio di silicone** (densità  $1.008 \pm 0.001 \text{ g/l}$ ).

**Soluzione madre di Percoll** (densità  $1.129 \text{ g/l}$ ) (Amersham Pharmacia Biotech).

Per determinare il movimento netto di  $^{36}\text{Cl}^-$  intracellulare, inteso come bilancio tra gli efflussi ed influssi dell'anione, vengono valutate le modificazioni del contenuto intracellulare di  $^{36}\text{Cl}^-$  ( $^{36}\text{Cl}_i$ ) utilizzando i PMN caricati con il  $^{36}\text{Cl}^-$  senza sottoporli alle procedure di lavaggio per l'eliminazione del radioisotopo dal mezzo esterno.

I PMN, caricati con il radioisotopo alla concentrazione di  $15\text{-}20 \times 10^6$  PMN/ml, vengono incubati a  $37^\circ\text{C}$  in provette di poli[HEMA], in assenza o in presenza di *C. albicans* in rapporto di 1:3 per 30 minuti, in continua agitazione. A fine incubazione,  $100 \mu\text{l}$  di campione diluiti in  $600 \mu\text{l}$  di tampone Hepes vengono posti in Eppendorf nelle quali sono stati precedentemente stratificati, partendo dal fondo:

- $100 \mu\text{l}$  di Percoll (soluzione madre)
- $600 \mu\text{l}$  di miscela di silicone/paraffina.

La miscela di silicone/paraffina serve a pulire il campione dal  $^{36}\text{Cl}^-$  extra- ed intercellulare, mentre il cuscinetto di Percoll evita la possibile rottura dei PMN, divenuti particolarmente fragili quando hanno fagocitato, contro il fondo della provetta. Le provette vengono quindi centrifugate a  $6000 \times g$  per 4 minuti. Terminata la centrifugazione si aspirano accuratamente i sovrantanti e i fondi delle provette, contenenti i pellet di cellule, vengono tagliati e messi nelle vial contenenti il liquido di scintillazione. La radioattività derivante dal  $^{36}\text{Cl}^-$  intrappolato nello spazio extracellulare del pellet risulta essere trascurabile (2% della radioattività totale del pellet).

La valutazione percentuale di  $^{36}\text{Cl}_i$  viene calcolata applicando la seguente formula:

$$\% ^{36}\text{Cl}_i = \frac{\text{(cpm associati alle cellule del pellet al tempo}_x \text{ di incubazione)}}{\text{(cpm associati alle cellule del pellet al tempo}_0 \text{ di incubazione)}} \times 100$$

### 3.9.3 Valutazione delle variazioni di $Cl^-$ tramite dosaggio chimico colorimetrico

#### Materiali

- **Chlorofix:** kit per il dosaggio di ioni  $Cl^-$  nei liquidi biologici per uso diagnostico (Menarini diagnostics, Firenze) che comprende:

#### 1) reattivo:

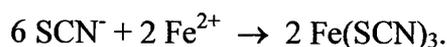
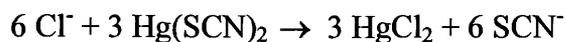
- mercurio tiocianato 2 mM
- ferro nitrato 20 mM
- acido nitrico 45 mM

#### 2) standard: sodio cloruro 100 mM

- **Soluzione isotonica di saccarosio** 250 mM in acqua

#### Metodo

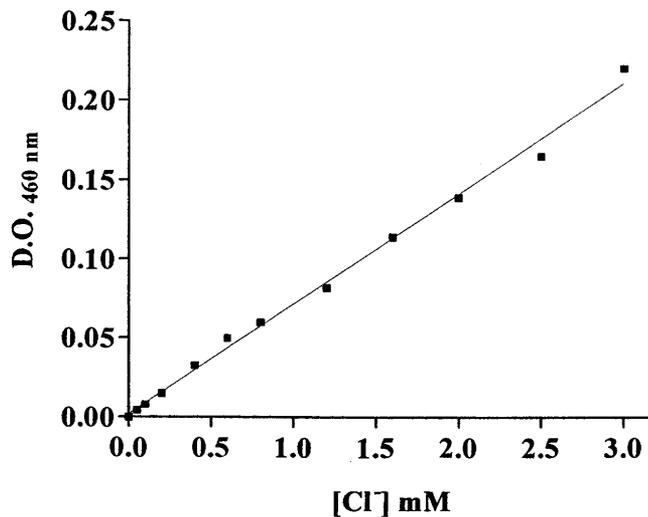
La valutazione delle variazioni del contenuto di  $Cl^-$  in PMN a riposo o stimolati viene effettuata utilizzando un saggio chimico in cui gli ioni cloruro reagiscono con i sali del reattivo secondo le seguenti reazioni:



La formazione di tiocianato ferroso al termine delle due reazioni determina il viraggio del saggio verso un colore rosso, la cui intensità a 460 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di  $Cl^-$  del campione.

Il kit utilizzato viene generalmente impiegato per test diagnostici su campioni di siero, liquor o urine, nei quali la concentrazione di  $Cl^-$  è sensibilmente più elevata di quella teorica prevista nei nostri lisati (2-3 mM). Abbiamo pertanto voluto verificare la sensibilità del metodo, costruendo una curva di taratura ottenuta ponendo nei pozzetti di una micropiastra 50  $\mu$ l di soluzioni a concentrazioni note di  $Cl^-$  e 200  $\mu$ l di reattivo. Dalla curva standard riportata in Figura 3.2 si può notare come il metodo sia

estremamente sensibile in quanto consente di valutare concentrazioni anche molto basse dell'anione.



**Figura 3.2** Curva di taratura per la valutazione degli ioni Cl<sup>-</sup> tramite dosaggio chimico colorimetrico. La curva di taratura è stata ottenuta ponendo nei pozzetti di una micropiastra soluzioni a concentrazioni note di Cl<sup>-</sup>. Il dosaggio è stato effettuato utilizzando il kit di sviluppo "Chlorofix", secondo le modalità descritte nel paragrafo 3.10.2 di Materiali e Metodi.

Il contenuto di Cl<sup>-</sup> nei PMN è stato misurato dopo l'incubazione delle cellule per 30 minuti a 37°C in assenza ed in presenza degli stimoli. I campioni vengono centrifugati a 400 x g per 4 minuti ed i pellet di cellule vengono risospesi in soluzione isotonica di saccarosio e successivamente lavati a 12000 x g per 12 secondi per eliminare il Cl<sup>-</sup> extracellulare presente nel medium. Dopo aver rimosso accuratamente i sovrinatanti, ai pellet di cellule vengono aggiunti 50 µl di acqua distillata per lisare i PMN. Dopo 20 minuti di lisi a temperatura ambiente e un ciclo di gelo-sgelo, utile a disgregare meglio le cellule, i campioni vengono centrifugati a 12000 x g per 12 secondi. 50 µl del sovrinatante vengono trasferiti nei pozzetti di una micropiastra, dove saranno aggiunti 200 µl di reattivo. Dopo 2 minuti, la piastra viene messa in un lettore per micropiastre (Power Wave X, Bio-Tek Instruments, Inc.) e le letture vengono effettuate ad una lunghezza d'onda di 460 nm.

### 3.10 Valutazione delle variazioni del $Ca^{2+}$ intracellulare in spettrofotofluorimetria (Fura 2-AM)

#### Materiali

**Fura 2-AM** (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) 4mM sciolto in DMSO

#### Metodo

La valutazione delle variazioni del  $Ca^{2+}$ , indotte da *C. albicans* e fMLP viene effettuata seguendo i movimenti del catione in granulociti neutrofilo umani precedentemente caricati con la sonda fluorescente Fura 2-AM.

I PMN, dopo essere stati isolati secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.1 vengono caricati alla concentrazione di  $5 \times 10^6$  /ml con il Fura 2-AM alla concentrazione finale di 2  $\mu$ M. L'incubazione viene portata avanti per 20 minuti a 37°C in agitazione e successivamente, previa diluizione di 5x con tampone Hepes preriscaldato a 37°C, per altri 20 minuti. Durante tale incubazione la sonda, che è permeabile alla membrana plasmatica dei PMN, entra facilmente nel citoplasma dove incontra un'esterasi che ha il ruolo di tagliare la porzione AM della sonda che a questo punto, diventando impermeabile, non può più fuoriuscire dalla cellula. La diluizione intermedia permette all'esterasi di completare il suo compito. terminate le incubazioni, il campione viene diluito 1:1 in tampone Hepes e successivamente sottoposto a due lavaggi a 250 x g per 7 minuti.

Ora i PMN, risospesi alla concentrazione di  $2.5 \times 10^6$  /ml, sono pronti per le diverse prove allo spettrofotofluorimetro. Un volume noto della sospensione di neutrofilo viene depositato in cuvette all'interno dello strumento e successivamente sottoposto alle diverse prove funzionali. Le diverse letture vengono effettuate impostando lo strumento alla  $\lambda$  di eccitazione di 340 nm e alla  $\lambda$  di emissione di 510 nm.

### **3.11 Preparazione di campioni per l'osservazione in microscopia elettronica a trasmissione (TEM)**

#### **Materiali**

**Tampone cacodilato** 0.1 M, pH 7.4

**Tampone tris/HCl** 0.1 M, pH 7.6

**Tetrossido di osmio** (OsO<sub>4</sub>) 1% in tampone cacodilato 0.1 M, pH 7.4

**Miscela di fissazione:** tampone cacodilato 0.2 M, glutaraldeide 4%, CaCl<sub>2</sub> 0.006 M in H<sub>2</sub>O apirogena

**Etanolo** 30-50-70-90-100%

**Resina epossidica**

**Miscela di reazione:** Tris/HCl 0.1 M, diaminobenzidina (DAB), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% finale.

#### **Metodo**

L'analisi in microscopia elettronica a trasmissione è stata effettuata su campioni ottenuti da un esperimento di fagocitosi realizzato utilizzando PMN e candide in rapporto di 1:3. Terminato il periodo di incubazione di 15', i campioni vengono posti in ghiaccio per bloccare la fagocitosi e successivamente centrifugati a 750 x g per 10'.

Ogni prova è stata effettuata in doppio per ottenere due campioni: uno è stato sottoposto al normale protocollo di preparazione per il TEM, l'altro è stato colorato con una colorazione citochimica per la mieloperossidasi (MPO). Ogni pellet conteneva all'incirca 10 x 10<sup>6</sup> PMN.

L'allestimento dei preparati è stato curato dalla Dott.ssa Francesca Vita (Dipartimento di Fisiologia e Patologia); l'osservazione dei preparati è stata effettuata con la collaborazione del sig. Claudio Gamboz (Centro Servizi Polivalenti di Ateneo, Settore Microscopia Elettronica) e la Prof. Maria Rosa Soranzo (Dipartimento di Fisiologia e Patologia).

### 3.12 Inibitori del trasporto di ioni Cl<sup>-</sup> utilizzati

Per valutare se gli efflussi di cloruro siano o meno coinvolti nella modulazione della funzionalità dei PMN sono stati utilizzati inibitori specifici del trasporto Cl<sup>-</sup> appartenenti a classi diverse.

Per valutare l'effetto di tali inibitori sulle risposte dei PMN è necessario preincubare la sospensione cellulare con i vari composti per 15 minuti a 37°C in agitazione per poi procedere ad una ulteriore incubazione in assenza o in presenza dello stimolo. Le concentrazioni degli inibitori verranno indicate di volta in volta nella sezione dei risultati.

<b>Inibitore</b>	<b>Famiglia</b>	<b>Bersaglio</b>	<b>Bibliografia</b>
<i>Acido Etacrinico</i> (EA)	Fenossiacetati	Canali del Cl <sup>-</sup> e Trasportatore del Cl <sup>-</sup> ATP- dipendente	<i>Shimizu Y. et al</i> 1993
<i>Acido Niflumico</i> (NA)	Derivato del acido carbossilico	Canali del Cl <sup>-</sup>	<i>Parij N. et al</i> 1998
<i>Fluoxetina</i> (FLX)	Propilammina	Canali del Cl <sup>-</sup>	<i>Maertens C. et al</i> 1999
<i>Acido Antracene 9</i> <i>Carbossilico (9-AC)</i>	Derivato del acido benzoico	Canali del Cl <sup>-</sup>	<i>Baron A. et al</i> 1991
<i>Acido 4-4'</i> <i>diisotiocianatostilbene-</i> <i>2-2'-disolfurico</i> (DIDS)	Acidi sulfonici	Canali del Cl <sup>-</sup>	<i>Skubitz K.M. et</i> <i>al</i> 1989
<i>Acido a ciano 4-</i> <i>idrossicinnamico</i> (CHC)	Derivati acido cinnamico	Trasportatore del Cl <sup>-</sup> ATP- dipendente	<i>Simchowitz L. et</i> <i>al</i> 1986
<i>Acido Mersalilico</i> (AM)	Fenossiacetati	Canali del Cl <sup>-</sup>	<i>Bretag A. H.</i> 1980
<i>Acido 5-nitro-2-(3-</i> <i>fenilpropilamino)</i> <i>benzoico</i> (NPPB)	Derivato del acido benzoico	Canali del Cl <sup>-</sup>	<i>Roch-Arveiller</i> <i>M. 1995 Scott-</i> <i>Ward Section</i> <i>T.S. 2004</i>

### 3.13 Inibitori delle vie di traduzione del segnale

<i>Sostanza</i>	<i>Derivazione</i>	<i>Target</i>
<i>Tossina pertossica</i>	Bordetella pertussis	Subunità $\alpha$ di proteine $G_i$
<i>Genisteina</i>	Isoflavone della soia	Inibisce l'associazione della proteina G alla PLC
<i>U73122</i>	Prodotto di sintesi	Inibisce le protein tirosin chinasi (PTK)
<i>Wortmannina</i>	Penicillium funiculosum	Inibisce l'IP3 chinasi (IP3K)

## 4. Risultati - Prima Parte

Parte dell'attività sperimentale svolta nell'ambito di questa tesi è stata dedicata alla messa a punto di alcuni protocolli utilizzati per valutare, tramite citofluorimetria a flusso, alcuni eventi connessi con l'attività candidocida dei PMN.

#### ***4.1 Metodo per la valutazione dell'associazione e della fagocitosi di *Candida albicans* da parte dei PMN mediante citofluorimetria a flusso***

Il metodo che qui viene descritto è stato messo a punto dal nostro laboratorio perfezionando una tecnica descritta da Sahlin et al. (1983). Questa metodica permette di valutare con precisione il processo di fagocitosi poiché consente di discriminare le particelle di *C. albicans* internalizzate da quelle legate alla superficie dei fagociti.

##### ***Materiali***

***Trypan blue***, Color Index 23850 (Merk, Darmstadt, Germania)

***Tampone citrato*** 0.1 M, pH 4.0 in NaCl 0.9%

***Blastospore di *Candida albicans**** uccise al calore, opsonizzate e marcate con 5(6)-FAM-SE

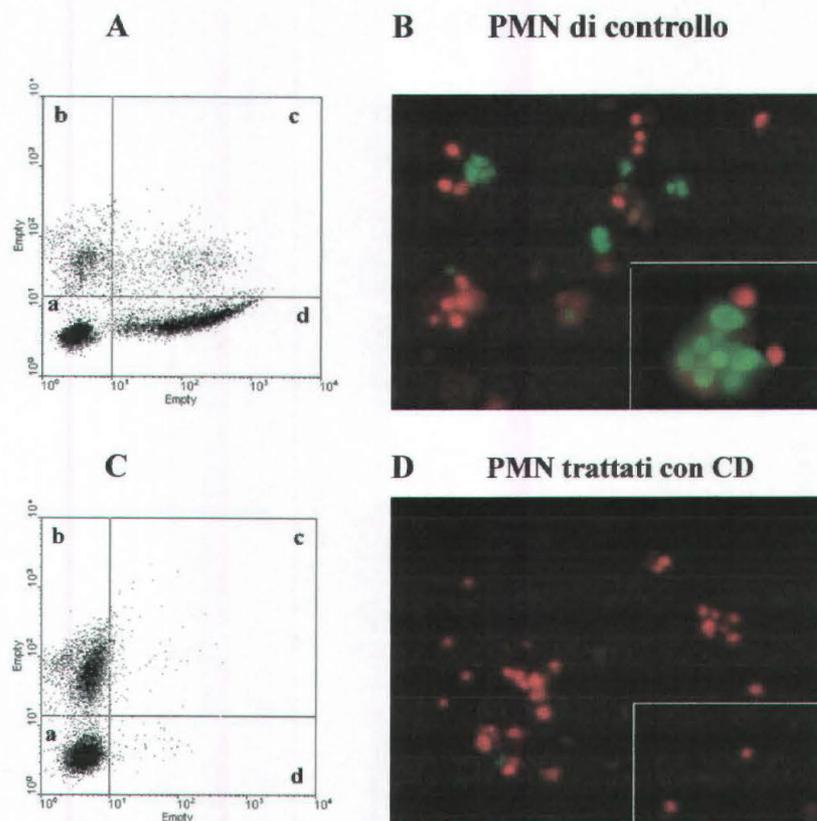
***Tampone Hepes-BSA*** 0.05%

***Metodo*** [Busetto S., Trevisan E. et al., 2004]

La metodica utilizzata permette di distinguere le particelle fungine adese alla membrana plasmatica dei PMN da quelle fagocitate grazie all'utilizzo del colorante Trypan blue. Quest'ultimo è un colorante "non vitale", capace cioè di colorare selettivamente le cellule morte e di venire escluso da quelle vive. Il TB inoltre ha un effetto "quenching" sulla fluorescenza verde ed ha la proprietà intrinseca di colorare di rosso il substrato cui si lega.

Aggiungendo il TB ad un campione di PMN incubati con particelle di *Candida albicans* marcate con 5(6)-FAM-SE, il colorante "spegne" la fluorescenza delle candide esterne colorandole nel contempo di rosso e lasciando inalterata la fluorescenza verde delle candide internalizzate, protette all'interno dei PMN vitali.

Una sospensione di PMN a  $2.4 \times 10^6/\text{ml}$  in tampone HEPES-BSA-ioni viene incubata con candide marcate con 5(6)-FAM-SE, solitamente in rapporto di 1:3, a  $37^\circ\text{C}$  per 30' in agitazione. Le prove vengono eseguite in provette di metacrilato, un particolare materiale plastico che evita che i PMN si attacchino alle pareti delle provette. Al termine dell'incubazione, la fagocitosi viene bloccata in ghiaccio e la sospensione cellulare viene trasferita in una provetta adatta all'analisi citofluorimetrica contenente un pari volume di tampone citrato 0.1 M a pH 4.0, addizionato di TB (125  $\mu\text{g}/\text{ml}$  finale). Il pH acido del tampone migliora l'effetto "quenching" del TB. Dopo un minuto di incubazione in ghiaccio, il campione viene analizzato al citofluorimetro a flusso. Viene precedentemente imposta una soglia di lettura per escludere dall'analisi le candide libere ed i detriti cellulari. I fagociti vengono quindi analizzati per la fluorescenza verde (FL-1, 530 +/- 30 nm) e per quella rossa (FL-3, 650 +/- 13 nm).



**Figura 4.1** Analisi in citofluorimetria a flusso ed in microscopia del processo di fagocitosi di *C. albicans* da parte di PMN. Nel dot-plot A si possono individuare, in base alla fluorescenza associata, quattro sottopopolazioni di PMN: **a.** PMN che non hanno legato *C. albicans*; **b.** PMN che hanno legato ma non fagocitato candide; **c.** PMN con particelle sia legate che fagocitate; **d.** fagociti che hanno solo candide internalizzate. Le immagini in B, realizzate fotografando lo stesso preparato in microscopia a fluorescenza, mettono in evidenza la diversa colorazione delle candide fagocitate (verdi) da quelle solamente associate (rosse). IL dot-plot C è rappresentativo di un campione trattato con citocalasina D (noto inibitore della polimerizzazione del citoscheletro), sostanza in grado bloccare l'ingestione ma non l'associazione di candide ai PMN. Le immagini in D dimostrano che le candide sono solamente associate alla membrana.

Nel dot-plot FL-1 vs FL-3 di un esperimento rappresentativo; si distinguono quattro popolazioni di cellule (Figura 4.1):

- a. PMN che non hanno interagito con le candide (cellule “bianche”);
- b. PMN con cellule fungine associate (cellule che esclusivamente fluorescono nel rosso);
- c. PMN con candide fagocitate ed associate (fluorescono sia nel verde che nel rosso)
- d. PMN con particelle fagocitate (fluorescono soltanto nel verde).

$$\% \text{ riconoscimento} = (b + c + d) / (a + b + c + d)$$

$$\% \text{ ingestione} = (c + d / b + c + d)$$

#### ***4.2 Valutazione dell'uccisione di *C. albicans* mediante citofluorimetria a flusso***

Questa metodica messa a punto da Bjerknes R. (1984) è stata da noi modificata in modo da permettere una valutazione rapida ed accurata dell'attività fungicida dei PMN nei confronti di *C. albicans*. Tale modifica consiste nell'effettuare un'acquisizione del campione per un *tempo prefissato* (ad esempio 1 minuto) e non in base ad un numero predefinito di eventi come si faceva con il metodo precedente. L'acquisizione a tempo permette un'analisi quantitativa più accurata dell'uccisione in quanto non solo quantifica le candide morte ma non completamente disgregate dall'azione litica dei PMN, e quindi propidio ioduro positive (come veniva fatto con l'acquisizione di un numero prefissato di eventi) ma tiene conto anche delle particelle fungine completamente lisate e quindi scomparse dal campione che non venivano incluse tra le candide morte analizzando il preparato con la tecnica precedentemente descritta in letteratura.

#### ***Materiali***

***Propidio ioduro*** (Sigma), preparato in PBS a 1 mg/ml

**PBS** (Phosphate Buffered Saline) soluzione salina tamponata: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4

**H<sub>2</sub>O** sterile, apirogena portata a pH 11.0

**Blastospore di *C. albicans*** coltivate e opsonizzate, secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.2.1

**Metodo** [Modificato da R. Bjerknes, 1984]

L'attività candidacida dei PMN viene valutata in citofluorimetria a flusso mediante l'utilizzo del propidio ioduro (PI), un fluorocromo rosso che si accumula, legandosi al DNA, esclusivamente nelle cellule morte.

I PMN risospesi in tampone HEPES-ioni alla concentrazione di  $8 \times 10^6$ /ml in provette di poli[HEMA], vengono incubati per i tempi previsti a 37°C in agitazione con le particelle fungine preventivamente opsonizzate. Al termine dell'incubazione, si preleva da ogni singolo campione un volume di 100 µl che viene poi sottoposto ad una centrifugazione di 12000 x g per 20 secondi. A questo punto si risospende il pellet in 900 µl di H<sub>2</sub>O, portata a pH 11.0, e si lascia ad incubare per 5 minuti a temperatura ambiente. Mediante questo passaggio i PMN vengono lisati completamente (Decleva E. et al., 2005) e possono per ciò rilasciare le particelle fungine fagocitate. Trascorsi i 5 minuti si aggiungono 100 µl di PBS 10x per ristabilire il pH neutro. A questo punto i lisati sono pronti per le letture al citofluorimetro per la fluorescenza rossa (FL-2, 585 +/- 42 nm), previa l'aggiunta di propidio ioduro (PI) alla concentrazione finale di 20 µg/ml.

E' molto importante analizzare i campioni sia al tempo zero (ovvero il prelievo viene fatto immediatamente dopo l'aggiunta delle candide), sia al tempo finale di incubazione, che in questo caso è di 60 minuti (tempo in cui l'uccisione di *C. albicans* è già massimale).

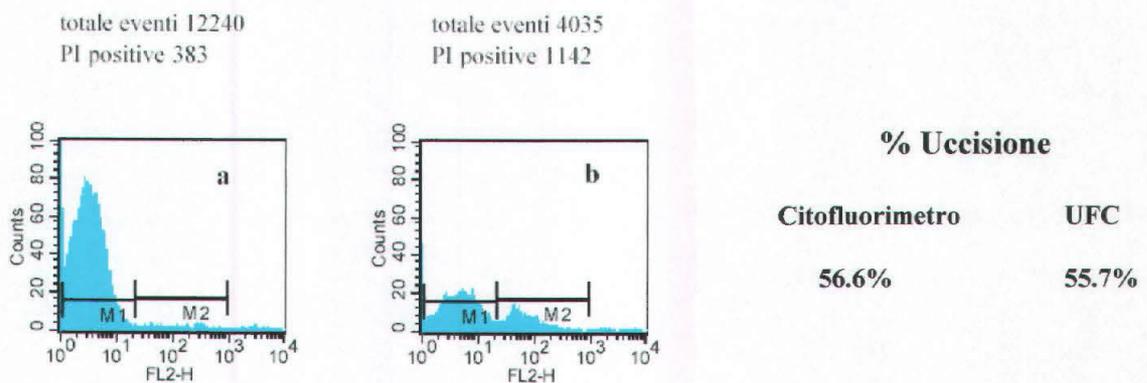
La valutazione dell'uccisione viene fatta leggendo il campione per un tempo prefissato (ad esempio 1 minuto) e non in base ad un numero predefinito di eventi come si faceva con il metodo precedente. Questo perché in ogni prova si è osservato un calo del numero totale di eventi tra  $t_0$  e  $t_{60}$ . La spiegazione di questa riduzione del numero di eventi viene fornita dal fatto che una discreta percentuale (20-40%) di particelle fungine fagocitate e uccise dai PMN diviene più fragile e quindi viene completamente disgregata dalla successiva procedura di lisi. Il computo della perdita del numero di eventi (candide disgregate) è rilevante ai fini di non sottostimare le candide uccise

tenendo conto solo di quelle positive al propidio. Ulteriori esperimenti hanno confermato che solo le candide morte (cioè quelle messe a contatto con i PMN) si lisano, dato che quelle vive (usate come controllo in assenza di PMN) sottoposte alle stesse condizioni rimangono intatte, protette molto probabilmente dalla loro parete integra.

Il grafico della Figura 4.2 mostra i risultati di un esperimento tipico: si notano due picchi ben separati che corrispondono rispettivamente al segnale di fluorescenza delle candide vive ( $M_1$ ) e di quelle morte ( $M_2$ ), propidio positive. Le percentuali di uccisione sono ottenute applicando la seguente formula:

$$\% \text{ uccisione} = \frac{\text{numero di eventi PI positivi} + (\text{numero totale di eventi a } t_0 - \text{numero totale di eventi } t_{60})}{\text{numero di eventi totali a } t_0}$$

I risultati ottenuti con questa metodica sono stati avvalorati valutando contemporaneamente l'attività candidacida con un saggio microbiologico standard che si basa sulla conta delle unità formanti colonie (UFC), realizzato secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.4. Questi risultati sono perfettamente in linea con i valori ottenuti in citofluorimetria.



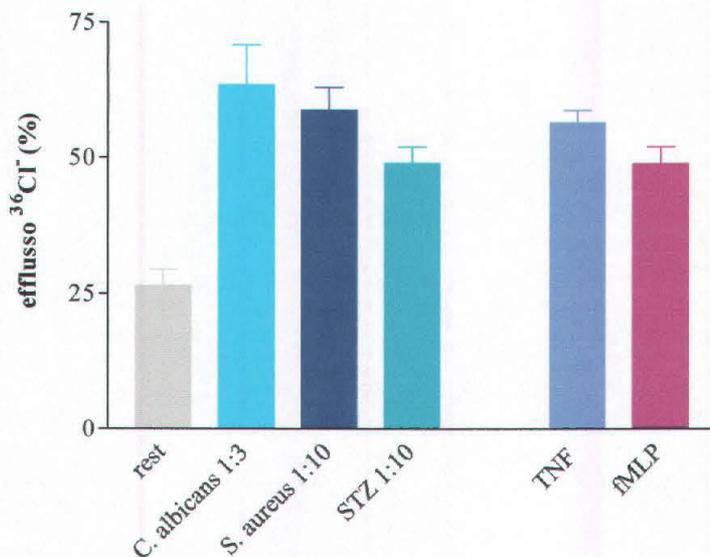
**Figura 4.2** Uccisione di *C. albicans* valutata mediante citofluorimetria a flusso. I dati riportati sono i risultati di un esperimento rappresentativo di valutazione dell'uccisione di *C. albicans* mediante citofluorimetria a flusso e conta delle unità formanti colonie (UFC). Viene indicato con il marker M1 le particelle fungine non fluorescenti (vive) e con M2 le particelle propidio ioduro positive (morte).

## 5. Risultati - Seconda Parte

### 5.1 Valutazione dei movimenti di ioni cloruro indotti da stimoli di diversa natura

E' noto che i PMN rispondono a diversi stimoli solubili, quali citochine e fattori chemiotattici, con un intenso efflusso di  $\text{Cl}^-$  che provoca una riduzione del contenuto intracellulare di  $\text{Cl}^-$  ( $\text{Cl}_i^-$ ). Questa diminuzione di  $\text{Cl}_i^-$  è un evento importante per l'attivazione di alcune risposte cellulari quali, per esempio, l'adesione a componenti della matrice extracellulare, lo "spreading", l'attivazione metabolica e la regolazione del pH intracellulare (Shimizu Y. et al, 1993; Menegazzi R. et al, 1999; Menegazzi R. et al, 2000).

Con i primi esperimenti descritti in questa tesi si è voluto verificare se anche stimoli particolati di diversa natura come *C. albicans*, *Staphylococcus aureus* e Zimosan (particelle fagocitabili costituite dalla parete dei lieviti) erano in grado di indurre movimenti di ioni  $\text{Cl}^-$  nei PMN.



**Figura 5.1 Efflussi di  $\text{Cl}^-$  indotti da stimoli particolati e solubili di varia natura.** I neutrofili sono stati caricati con il radioisotopo  $^{36}\text{Cl}^-$  a  $37^\circ\text{C}$  per i tempi previsti con i vari tipi di stimoli, come descritto nel paragrafo 3.9.1 del capitolo dei Materiali e Metodi. Al termine dell'incubazione seguono due lavaggi in PBS-BSA, e la risospensione delle cellule in tampone Hepes, quindi si procede incubano le cellule con i diversi stimoli. Alla fine delle incubazioni i campioni vengono centrifugati e viene misurata la quantità di  $^{36}\text{Cl}^-$  presente nel sovrantante. STZ: zimosan opsonizzato; TNF: fattore di necrosi tumorale; fMLP: fenil-metionil-leucil-fenilalanina. I dati riportati sono una media  $\pm$  ES di 3-5 esperimenti.

Gli efflussi di  $\text{Cl}^-$  sono stati analizzati utilizzando PMN caricati con il radioisotopo  $^{36}\text{Cl}^-$  secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.9.1 del capitolo Materiali e Metodi. Dopo il caricamento con  $^{36}\text{Cl}^-$  i PMN venivano lavati con tampone HEPES privo di  $^{36}\text{Cl}^-$  e quindi sottoposti alle prove funzionali. Al termine del periodo di incubazione previsto, si misurava la quantità di  $^{36}\text{Cl}^-$  rilasciata nel sovrantante.

Come si evidenzia nella Figura 5.1, gli esperimenti hanno dimostrato che anche le particelle fagocitabili sono in grado di indurre efflussi di  $\text{Cl}^-$  di entità paragonabile a quella di stimoli solubili, il TNF e l'fMLP, noti per la loro capacità di stimolare tali efflussi.

## 5.2 Valutazione dell'efflusso di $\text{Cl}^-$ in PMN stimolati con *C. albicans*

L'attività sperimentale è quindi proseguita utilizzando un determinato tipo di particella fagocitabile, ovvero *C. albicans*. Questa scelta è stata dettata dall'intenzione di verificare successivamente l'esistenza di una correlazione tra movimenti di  $\text{Cl}^-$ , fagocitosi e attività candidacida dei PMN.

Inizialmente è stata condotta una serie di esperimenti incubando PMN e *C. albicans* in rapporti diversi (1:1, 1:3, 1:5). Come si può osservare nella Figura 5.2, le particelle fungine sono in grado, in tutte le condizioni, di indurre nei leucociti un efflusso di ioni  $^{36}\text{Cl}^-$  sensibilmente più elevato di quello misurato nei PMN a riposo. Si può osservare inoltre che già al rapporto di 1:3 si raggiungono valori pressoché massimali di efflusso ed è per questo motivo che abbiamo scelto di mantenere tale rapporto per le successive prove sperimentali.

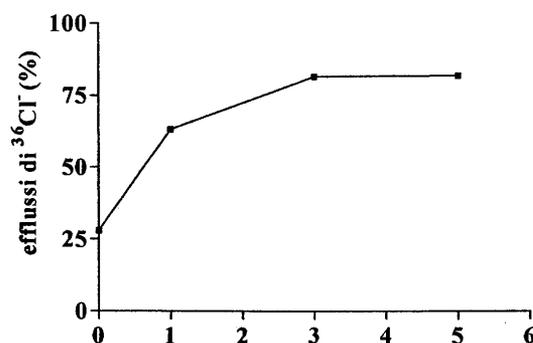


Figura 5.2 Efflussi di ioni cloruro indotti da quantità crescenti di *C. albicans*: i valori sono i risultati di un esperimento in cui abbiamo misurato l'efflussi di  $^{36}\text{Cl}^-$  in campioni contenenti PMN e candide in rapporto di 1:1, 1:3 e 1:5.

### 5.2.1 Valutazione delle variazioni del contenuto intracellulare di $Cl^-$ in PMN stimolati da *C. albicans*

Per verificare se l'efflusso osservato nelle prove precedenti fosse un efflusso netto o semplicemente uno scambio di ioni  $Cl^-$  tra i compartimenti intra ed extracellulare, abbiamo valutato il contenuto intracellulare di  $Cl^-$  ( $Cl^-_i$ ) nei PMN incubati con *C. albicans*.

Dai dati riportati in Tabella I si può osservare che, pur misurando un notevole efflusso di  $^{36}Cl^-$ , il contenuto dell'anione non diminuisce in presenza dello stimolo particolato, anzi mostra un discreto aumento. Questo risultato potrebbe essere interpretato ammettendo che le cellule includano nel fagosoma, oltre alle candide,  $^{36}Cl^-$  che viene mantenuto nel mezzo esterno durante l'incubazione (vedi paragrafo 3.9.2).

<i>Condizioni</i>	<i>Efflusso di <math>^{36}Cl^-</math> (%)</i>	<i>% <math>^{36}Cl^-_i</math></i>
<i>A riposo</i>	12.0	106.0
<i>C. albicans</i>	49.8	124.0

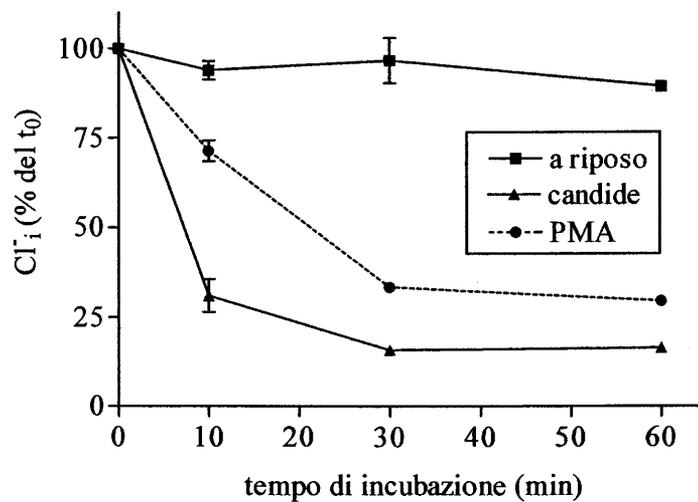
**Tabella I** Valutazione dell'efflusso e del contenuto di  $^{36}Cl^-$  in PMN a riposo e stimolati da *C. albicans*. I PMN, caricati con  $^{36}Cl^-$  secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.9.1 di Materiali e Metodi, sono stati incubati a 37°C in assenza o in presenza di *C. albicans* (rapporto PMN:candide di 1:3). Dopo 30 minuti di incubazione, l'efflusso ed il contenuto di  $^{36}Cl^-$  sono stati valutati secondo le procedure descritte nei paragrafi 3.9.1 e 3.9.2 di Materiali e Metodi. I valori riportati sono i risultati di un esperimento condotto in duplicato.

Questa ipotesi è stata confermata dai risultati di un esperimento condotto in presenza di  $^{14}C$ -inulina, una molecola che, per le sue dimensioni, non è in grado di oltrepassare la membrana plasmatica del neutrofilo e può quindi essere utilizzata come marker di fluido extracellulare. Questa prova ha effettivamente dimostrato che i PMN incubati con *C. albicans*, a differenza di quelli a riposo, inglobano fluido extracellulare durante la fagocitosi. Quindi, poiché l'utilizzo del radioisotopo non si è rivelato adatto per la valutazione del  $Cl^-_i$ , abbiamo deciso di quantificare il contenuto dell'anione con un dosaggio di tipo chimico dotato di elevata sensibilità (vedi paragrafo 3.9.3 nella sezione Materiali e Metodi).

Prove preliminari di valutazione della concentrazione intracellulare del  $Cl^-$ , condotte su due distinte popolazioni di PMN a riposo, ci hanno consentito di verificare

innanzitutto la validità del metodo: i valori di  $[Cl^-]_i$  ottenuti, 90.8 mM e 113 mM, sono infatti perfettamente in linea con i valori riportati in letteratura (Simchowicz L. et al, 1986).

La Figura 5.3 illustra i risultati di alcuni esperimenti in cui siamo andati a valutare la cinetica delle variazioni del  $Cl^-_i$  in PMN a riposo, incubati con *C. albicans* o stimolati con PMA, un agonista solubile non fisiologico usato come controllo per la sua nota capacità di indurre un calo del  $Cl^-_i$  (Myers J.B. et al, 1990). Come si può osservare, mentre il  $Cl^-_i$  dei PMN a riposo si mantiene pressochè inalterato nel tempo, il cloruro contenuto nei leucociti stimolati con *C. albicans*, o con PMA, diminuisce drasticamente per effetto di un efflusso netto di  $Cl^-$ .



**Figura 5.3** Cinetica della diminuzione del contenuto intracellulare di cloruro in PMN stimolati con *C. albicans*: valutazione con dosaggio chimico colorimetrico. I PMN, risospesi in tampone HEPES-ioni, sono stati incubati a 37°C in assenza di stimolo o in presenza di *C. albicans* o PMA (20 ng/ml). Al termine dei tempi di incubazione previsti, il contenuto di cloruro intracellulare veniva valutato con un dosaggio colorimetrico, secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.9.3 del capitolo Materiali e Metodi. I dati ottenuti sono le medie  $\pm$  ES di 2-3 esperimenti condotti in duplicato.

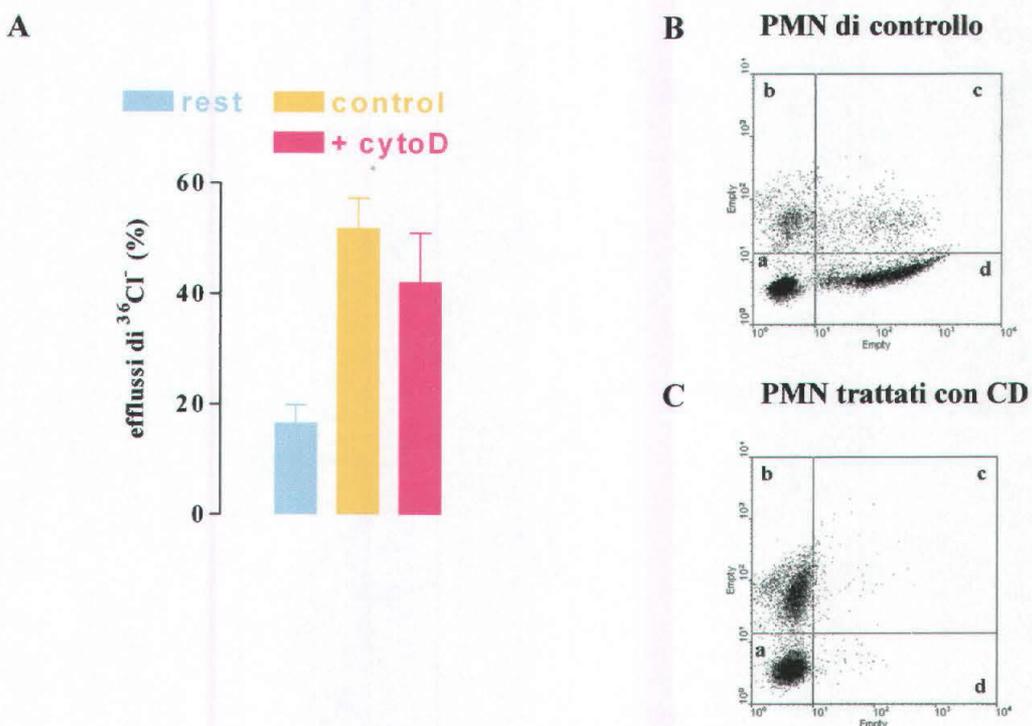
E' interessante notare come la diminuzione del  $Cl^-_i$  sia molto marcata ed irreversibile, a differenza di quanto avviene nei PMN stimolati da agonisti solubili fisiologicamente rilevanti (per es., TNF, GM-CSF, IL-8) in cui questa diminuzione ha carattere transitorio (Shimizu Y. et al, 1993).

### 5.3 Ruolo della fagocitosi nell'attivazione degli efflussi di $^{36}\text{Cl}^-$ nei PMN

Dopo aver dimostrato che anche gli stimoli particolati sono in grado indurre efflussi netti di cloruro, abbiamo voluto verificare se per l'attivazione di questo evento fosse necessaria l'ingestione delle particelle fagocitabili o semplicemente bastasse l'impegno dei recettori di membrana coinvolti nel riconoscimento dei microrganismi. Per verificare il ruolo del citoscheletro nell'attivazione degli efflussi di  $\text{Cl}^-$  sono state allestite delle prove di valutazione degli efflussi di  $\text{Cl}^-$ , in presenza o in assenza di un noto inibitore della polimerizzazione del citoscheletro, la citocalasina D (CD).

Nel pannello A della Figura 5.4 possiamo osservare che la presenza di CD non altera di molto l'efflusso di  $\text{Cl}^-$  in PMN stimolati con *C. albicans*.

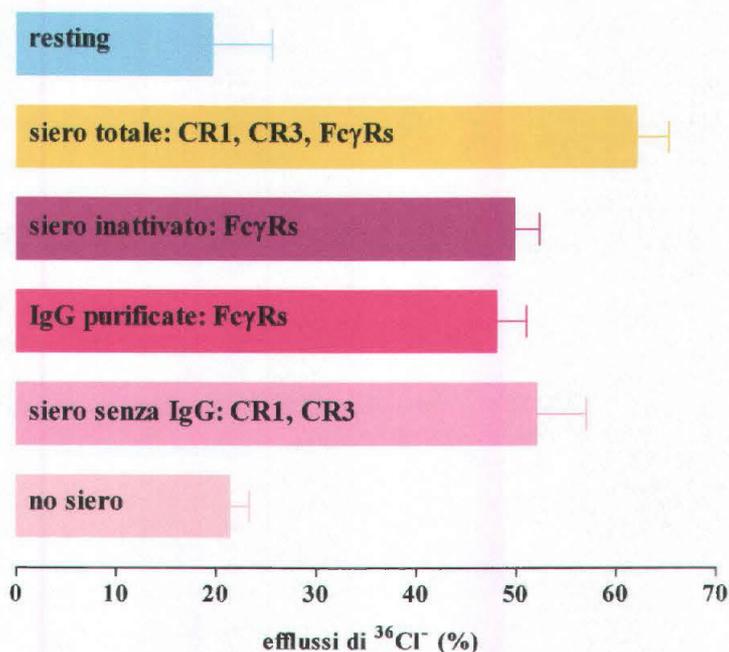
Nei pannelli B e C della Figura 5.4 sono riportati i dot plot di un esperimento di valutazione dell'associazione/ingestione di particelle fagocitabili in presenza o meno di CD. Da questi si evidenzia che la CD è in grado di bloccare la fagocitosi delle particelle fungine ma non il riconoscimento da parte dei recettori dei PMN dei specifici ligandi presenti sulla parete delle candide.



**Figura 5.4 Efflussi di  $^{36}\text{Cl}^-$  in neutrofili fagocitanti in presenza ed in assenza di CD. Analisi della fagocitosi mediante citofluorimetria a flusso.** **A.** Gli efflussi di ioni  $\text{Cl}^-$  sono stati valutati mediante la metodica descritta nel paragrafo 3.9.1 del capitolo Mat. e Met.. Le cellule sono state incubate con *C. albicans* (1:3) in assenza (ctrl) ed in presenza di citocalasina D (CD). **B. e C.** Analisi della fagocitosi in citofluorimetria a flusso secondo la metodica descritta al paragrafo 4.1. **B.** PMN di controllo **C.** PMN incubati in presenza con CD 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Possiamo quindi affermare che il riarrangiamento del citoscheletro non è coinvolto nell'attivazione degli efflussi di  $\text{Cl}^-$ . Siamo andati successivamente a verificare il possibile ruolo dei recettori per le opsonine nell'attivazione dei movimenti di ioni cloruro. Per far ciò sono stati allestiti una serie di esperimenti per la valutazione degli efflussi di  $\text{Cl}^-$  utilizzando come stimolo candida non opsonizzate od opsonizzate con siero totale, siero scomplementato (IgG), siero deprivato di anticorpi (C3b/b<sub>i</sub>) o con IgG umane purificate.

Nel grafico della Figura 5.5 sono rappresentati i risultati di questi esperimenti. Appare evidente che, utilizzando candida non opsonizzate, gli efflussi di  $\text{Cl}^-$  sono del tutto simili a quelli delle cellule non stimulate (resting). Si può anche notare che le diverse condizioni di opsonizzazione non causano differenze significative negli efflussi. Questi risultati portano ad un'ulteriore conferma dell'importanza del riconoscimento nell'attivazione dell'efflusso di  $\text{Cl}^-$  e dimostrano, inoltre, che entrambi i recettori per le opsonine (Fcy e CR3) sono in grado di segnalare per l'attivazione di tale efflusso.



**Figura 5.5** Efflussi di  $\text{Cl}^-$  indotti da particelle fungine (*C. albicans*) sottoposte a diverse condizioni di opsonizzazione. Il protocollo di opsonizzazione seguito è stato descritto al paragrafo 3.2 del capitolo Materiali e Metodi. I movimenti di ioni di cloruro sono state misurate usando la metodica descritta al paragrafo 3.9.1 del capitolo Materiali e Metodi.

Questo risultato da un lato conferma i dati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio che hanno dimostrato la capacità dell'integrina CD11b/CD18 (CR3) di innescare efflussi di Cl<sup>-</sup> (Menegazzi R. et al., 1999), e dall'altro dimostra per la prima volta che anche il/i recettore/i per la porzione Fc delle IgG possiede questa proprietà.

#### 5.4 Effetto degli inibitori degli efflussi di Cl<sup>-</sup> sul riconoscimento e l'ingestione di *C. albicans*

Il processo che porta all'uccisione di microrganismi patogeni presenti in sede d'infezione da parte dei PMN può essere suddiviso in più fasi: riconoscimento ed adesione del patogeno, ingestione, uccisione e digestione dei microrganismi.

Volendo studiare l'esistenza di una possibile correlazione tra attività candidacida e movimenti di cloruro si è pensato di valutare l'effetto di alcuni inibitori del trasporto di questo anione, appartenenti a famiglie strutturalmente non correlate, su tale attività (Tabella II).

<b>Inibitore</b>	<b>Famiglia</b>	<b>Bersaglio</b>	<b>Bibliografia</b>
<b>Acido Etacrinico (EA)</b>	Fenossiacetati	Canali del Cl <sup>-</sup> e Trasportatore del Cl <sup>-</sup> ATP-dipendente	<i>Shimizu Y. et al 1993</i>
<b>Acido Niflumico(NA)</b>	Derivato del acido carbossilico	Canali del Cl <sup>-</sup>	<i>Parij N. et al 1998</i>
<b>Fluoxetina (FLX)</b>	Propilammina	Canali del Cl <sup>-</sup>	<i>Maertens C. et al 1999</i>
<b>Acido Antracene 9 Carbossilico (9-AC)</b>	Derivato del acido benzoico	Canali del Cl <sup>-</sup>	<i>Baron A. et al 1991</i>
<b>Acido 4-4'- diisotiocianatostilbene- 2-2'-disolfurico (DIDS)</b>	Acidi sulfonici	Canali del Cl <sup>-</sup>	<i>Skubitz K.M. et al 1989</i>
<b>Acido <math>\alpha</math> ciano 4- idrossicinnamico (CHC)</b>	Derivati acido cinnamico	Trasportatore del Cl <sup>-</sup> ATP-dipendente	<i>Simchowit L. et al 1986</i>
<b>Acido Mersalilico (MA)</b>	Fenossiacetati	Canali del Cl <sup>-</sup>	<i>Bretag A. H. 1980</i>
<b>Acido 5-nitro-2-(3- fenilpropilamino) benzoic (NPPB)</b>	Derivato del acido benzoico	Canali del Cl <sup>-</sup>	<i>Roch-Arveiller M. 1995 Scott-Ward Section T.S. 2004</i>

Tabella II Inibitori del trasporto di ioni cloruro utilizzati nel corso degli esperimenti descritti in questa tesi

Si è ritenuto però indispensabile valutare, in primis, l'effetto degli inibitori sul riconoscimento e l'ingestione delle particelle fungine da parte dei PMN. Ciò al fine di verificare che gli inibitori prescelti non alterassero questi due stadi del processo di uccisione, poiché, se ciò fosse avvenuto, non avremmo potuto trarre conclusioni corrette. La Tabella III riporta l'insieme dei dati raccolti in questi esperimenti.

<i>Risposta (%)</i>		
<i>preincubazione</i>	<i>riconoscimento</i>	<i>ingestione</i>
tampone	100.0 <sup>c</sup>	100.0 <sup>c</sup>
solvente <sup>d</sup>	97.2	95.9
EA		
50 $\mu$ M	103.1	105.6
150 $\mu$ M	101.2	101.0
250 $\mu$ M	60.1	36.9
DIDS		
30 $\mu$ M	101.3	100.8
60 $\mu$ M	55.2	48.0
120 $\mu$ M	51.8	36.5
MA		
500 $\mu$ M	150.1	140.5
1000 $\mu$ M	180.6	150.0
2500 $\mu$ M	160.5	145.4
CHC		
500 $\mu$ M	130.7	140.4
1000 $\mu$ M	150.1	160.4
2500 $\mu$ M	145.8	70.6
9-AC		
500 $\mu$ M	101.8	100.4
1000 $\mu$ M	102.2	101.2
2500 $\mu$ M	45.7	55.2
NA		
50 $\mu$ M	102.5	100.1
100 $\mu$ M	108.0	95.9
200 $\mu$ M	105.1	106.2
NPPB		
50 $\mu$ M	99.3	101.9
100 $\mu$ M	93.0	103.1
150 $\mu$ M	97.0	103.1

**Tabella III.** Effetto di inibitori del trasporto di Cl sulla fagocitosi di *Candida albicans*

Questo screening iniziale ha consentito di suddividere gli inibitori in tre gruppi:

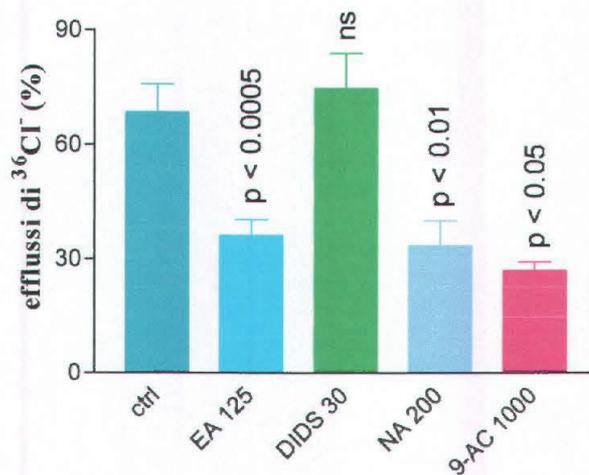
- un gruppo costituito da sostanze che non alteravano, o alteravano minimamente (~ 10%) i due fenomeni (EA, NA, NPPB e FLX);
- un gruppo costituito da sostanze che potevano essere usate solo a determinate concentrazioni (DIDS, 9-AC);
- un gruppo costituito da sostanze che, a tutte le concentrazioni utilizzate, alteravano marcatamente (> 20%) l'associazione e/o l'ingestione (MA e CHC).

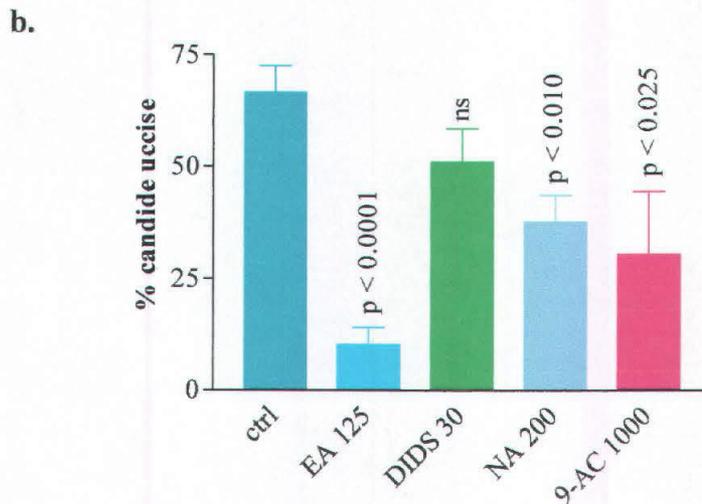
L'osservazione al microscopio ottico in contrasto di fase dei PMN incubati con gli inibitori conferma che le sostanze che alteravano la fagocitosi (MA e CHC) determinavano anche alterazione e sofferenza delle cellule. Queste prove portano quindi a concludere che gli inibitori che si possono usare nel proseguo degli esperimenti sono: EA, NA, NPPB, DIDS, 9-AC e FLX.

### 5.5 Relazione tra efflussi di Cl<sup>-</sup> e uccisione di *C. albicans*

Una volta scelti gli inibitori adatti abbiamo voluto verificare l'esistenza di una relazione causale tra efflussi di cloruro e attività candidacida dei PMN, allestendo degli esperimenti che ci permettessero di valutare in parallelo questi due eventi.

a.





**Figura 5.6** Effetto degli inibitori del trasporto di ioni cloruro sui movimenti di ioni  $Cl^-$  e sull'uccisione di *C. albicans*. L'uccisione di *C. albicans* è stata valutata in citofluorimetria a flusso mediante la tecnica da noi messa a punto descritta nel paragrafo 4.2. Gli efflussi sono stati valutati secondo la metodica descritta nel paragrafo 3.9.1. I PMN sono stati preincubati con gli inibitori e quindi incubati con le particelle fungine per i tempi previsti. I dati riportati sono una media  $\pm$  ES di 3-5 esperimenti. Le concentrazioni degli inibitori sono espresse come  $\mu$ mol/L.

I grafici a e b della Figura 5.6 riassumono i dati di una serie di esperimenti in cui i PMN sono stati incubati con gli inibitori alle concentrazioni che, in base a esperimenti preliminari risultavano, più adatte al modello sperimentale da noi scelto. Come si può osservare EA, NA e 9-AC inibivano sia gli efflussi di  $Cl^-$  sia l'uccisione di *C. albicans* in maniera coordinata, mentre il DIDS che non inibiva gli efflussi di cloruro non modificava significativamente l'attività candidacida. Questi dati suggeriscono quindi l'esistenza di una relazione causale tra i due eventi.

### **5.6 Ruolo degli efflussi di ioni $Cl^-$ nell'attivazione dei meccanismi microbicidi dei PMN**

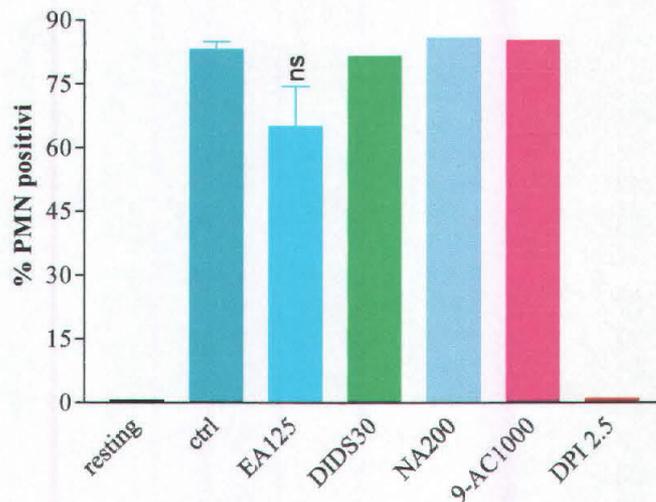
Dopo aver dimostrato che all'inibizione degli efflussi di cloruro si accompagna una proporzionale diminuzione dell'attività microbicida dei PMN, ci siamo chiesti quale o quali meccanismi, coinvolti nel processo multistadio dell'uccisione di microrganismi patogeni fossero correlabili agli efflussi.

Ricordiamo brevemente che i meccanismi microbicidi dei PMN sono divisi in due gruppi: meccanismi ossigeno-dipendenti (dipendenti dall'attivazione del

metabolismo ossidativo) ed ossigeno-indipendenti (dipendenti dal rilascio di sostanze granulari). Per tale motivo i nostri studi sono proseguiti con l'intento di analizzare in dettaglio l'effetto degli inibitori degli efflussi di  $Cl^-$  sull'attivazione e regolazione di questi due meccanismi.

### 5.6.1 Correlazione tra efflussi di $Cl^-$ e attivazione del metabolismo ossidativo

Per studiare l'effetto degli inibitori dei flussi di  $Cl^-$  sull'attivazione del metabolismo ossidativo abbiamo utilizzato una metodica di citofluorimetria a flusso, descritta nel paragrafo 3.6 del capitolo Materiali e Metodi, che permette di analizzare in modo rapido e preciso, grazie all'uso di una sonda fluorescente, la diidrodamina 123 (DHR), sensibile alla produzione di  $H_2O_2$ , i campioni allestiti. Dal grafico della Figura 5.7 si vede chiaramente come nessuno degli inibitori usati induca una riduzione significativa della produzione di  $H_2O_2$ .



**Figura 5.7** Effetto degli inibitori degli efflussi di ioni  $Cl^-$  sulla produzione di acqua ossigenata da parte di PMN stimolati con *C. albicans*. I PMN, risospesi in tampone HEPES-ioni, sono stati preincubati con gli inibitori per 15', caricati successivamente con la sonda DHR (vedi protocollo descritto nel paragrafo 3.6) e quindi incubati per 30' con *C. albicans*. Terminata l'incubazione i campioni sono stati analizzati in citofluorimetria a flusso. Gli istogrammi riportati in Figura sono le medie di 2-3 esperimenti. Le barre indicano l'errore standard.

L'attendibilità della metodica utilizzata è stata verificata preincubando i PMN con il difenileniodonio (DPI) (Ellis J.A. et al., 1988). Il DPI infatti reagisce con il gruppo eme del citocromo  $b_{558}$  determinando l'inibizione irreversibile del complesso

enzimatico della NADPH-ossidasi e bloccando, in ultima istanza, l'attivazione dei meccanismi ossigeno-dipendenti (Baron A., 1991; Vowells S.J., 1995). Come illustrato nella Figura 5.7 il DPI abbatteva completamente la produzione di  $H_2O_2$  in neutrofili fagocitanti *C. albicans*.

I risultati ottenuti sono stati inoltre confermati da esperimenti analoghi in cui l'effetto degli inibitori sull'attivazione del metabolismo ossidativo è stato valutato misurando la produzione di anione superossido ( $O_2^-$ ) mediante una tecnica spettrofotometrica che misura la quantità di citocromo c ridotto dall'anione (dati non mostrati).

Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono che l'effetto degli inibitori sull'attività microbica non è imputabile ad un'interferenza con l'attivazione del metabolismo ossidativo.

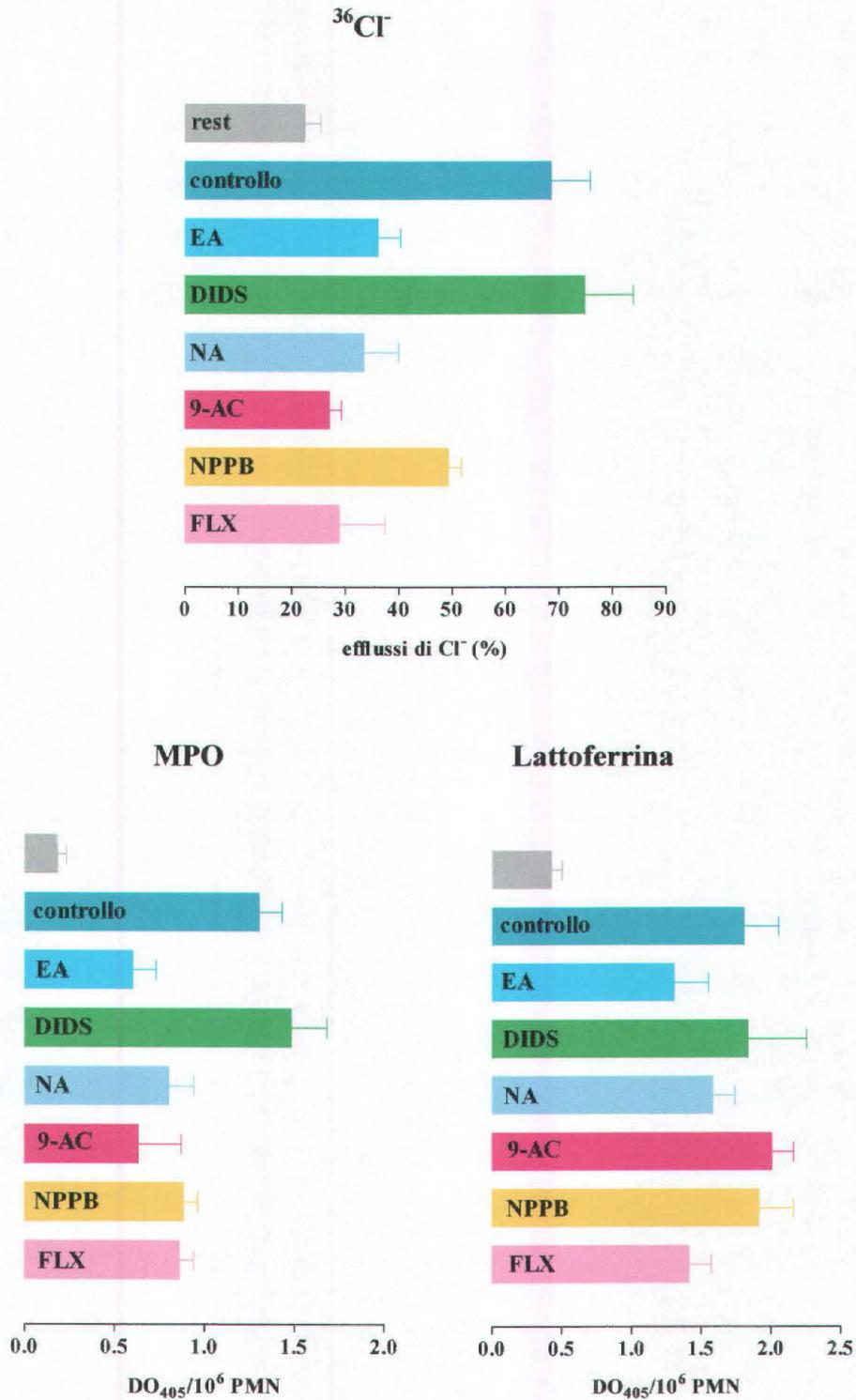
### **5.6.2 Correlazione tra efflussi di cloruro e rilascio di componenti granulari**

A questo punto siamo andati a valutare l'effetto degli inibitori del trasporto di cloruro sul fenomeno della degranulazione, responsabile del rilascio di proteine microbiche nel fagosoma. A tal fine abbiamo utilizzato metodiche che misurassero l'entità del rilascio di sostanze granulari markers dei granuli azurofilici, mieloperossidasi (MPO), e dei granuli specifici, lattoferrina (LF).

I PMN sono stati sottoposti da prima ad un'incubazione di 15' a 37°C in assenza od in presenza degli inibitori e poi ad un'ulteriore incubazione per 30 minuti a 37°C con le particelle fungine. Al termine dell'esposizione allo stimolo i campioni venivano centrifugati a 400 x g per 4 minuti a 4°C per poter prelevare successivamente volumi noti dei sovranatanti. I dosaggi di MPO e LF venivano poi eseguiti secondo le modalità descritte nei paragrafi 3.7 del capitolo Materiali e Metodi.

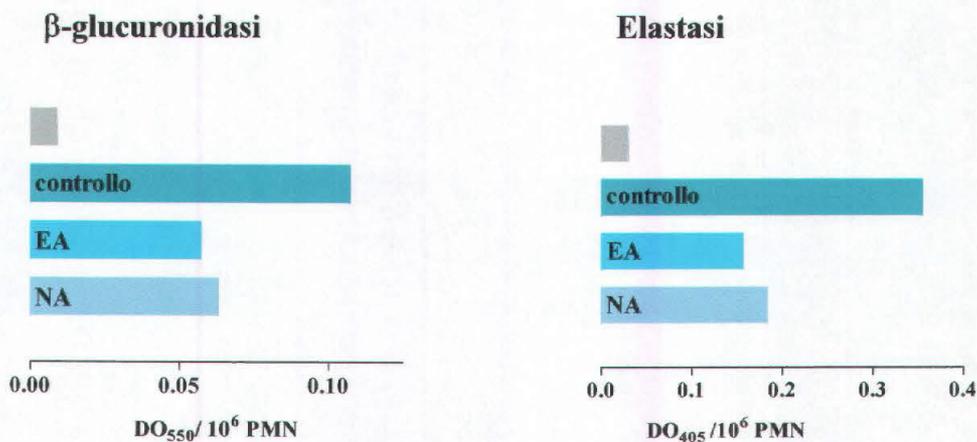
I risultati raccolti in Figura 5.8 indicano che solo le sostanze che si erano dimostrate capaci di inibire gli efflussi di cloruro (EA, NA, NPPB, 9-AC e FLX) esercitavano un effetto analogo anche sul rilascio di MPO; il DIDS, che non era in grado di inibire l'efflusso, non inibiva nemmeno il rilascio di MPO.

Completamente diversa appariva la situazione riguardante il rilascio di LF. La Figura 5.8 evidenzia infatti che il rilascio dei granuli specifici veniva modestamente inibito dall'azione di alcuni composti (EA, NA e FLX), o rimaneva del tutto inalterato quando i PMN venivano incubati con NPPB, 9-AC e DIDS.



**Figura 5.8** Analisi dell'effetto degli inibitori degli efflussi di ioni cloruro sui movimenti di ioni cloruro e sul rilascio di componenti granulari (MPO e Lattoferrina) in PMN stimolati con *C. albicans*. Le metodiche usate sono descritte rispettivamente nei paragrafi 3.7 e 3.9.1. Prima di aggiungere lo stimolo i neutrofili sono stati incubati con gli inibitori per 15' a 37°C. MPO: mieloperossidasi; lattoferrina; EA: acido etacrinico; DIDS: diisotiocianatostilbene disulfonico; NA: acido niflumico; 9-AC: acido antracene 9 carbossilico; NPPB: nitrofenilpropilaminobenzoato; FLX: fluoxetina

Esperimenti successivi ci hanno permesso di escludere che l'effetto degli inibitori sul rilascio di MPO dipendesse da un effetto aspecifico delle sostanze utilizzate sull'attività enzimatica dell'MPO. Un primo controllo è stato effettuato valutato il rilascio di altri due enzimi contenuti esclusivamente nei granuli azurofilici: elastasi e  $\beta$ -glucuronidasi. I grafici riportati in Figura 5.9 evidenziano che in entrambi i test le sostanze utilizzate hanno un effetto inibitorio analogo a quello riscontrato nei confronti del rilascio di MPO.



**Figura 5.9** Effetto di EA ed NA sugli rilascio dei granuli azurofilici valutato mediante due enzimi marker elastasi e  $\beta$ -glucuronidasi. Le quantità di elastasi e  $\beta$ -glucuronidasi rilasciate sono state valutate secondo le metodiche descritte nel paragrafo 3.7. I dati riportati indicano i risultati di un esperimento rappresentativo.

Un secondo controllo che abbiamo voluto fare, sempre per escludere un'interferenza degli inibitori sulla reazione perossidasi, è stato quello di allestire delle prove in cui veniva testato l'effetto delle sostanze utilizzate sulla attività perossidasi di perossidasi umana purificata. Come si può vedere nella Tabella IV, nessun inibitore interferisce sulla reazione enzimatica, essendo i valori ottenuti del tutto simili a quelli del controllo.

<i>Inibitori</i>	<i>DO<sub>405</sub> / 10<sup>6</sup> PMN</i>
<i>Controllo</i>	0.559
<i>EA 300 <math>\mu</math>M</i>	0.461
<i>DIDS 300 <math>\mu</math>M</i>	0.505
<i>NA 300 <math>\mu</math>M</i>	0.548
<i>9-AC 300 <math>\mu</math>M</i>	0.595
<i>NPPB 150 <math>\mu</math>M</i>	0.527

**Tabella IV** Effetto degli inibitori del trasporto di  $Cl^-$  sull'attività perossidasi di MPO umana purificata. La quantità di MPO è stata valutata con la metodica descritta al paragrafo 3.7.1

Ulteriori controlli sono stati eseguiti per valutare se queste sostanze risultavano tossiche per le cellule. Per fare ciò abbiamo dosato il contenuto della lattico deidrogenasi nelle cellule trattate con i diversi inibitori secondo la metodica descritta nel paragrafo 3.8 del capitolo Materiali e Metodi. I risultati ottenuti hanno dimostrato che nessuna delle sostanze utilizzate modificavano i livelli basali di LDH delle cellule (dati non mostrati).

Nel loro insieme questi risultati indicano che, in questo modello sperimentale, esiste una correlazione tra modificazioni di  $Cl^-$  intracellulare e rilascio di componenti granulari, in particolare dei granuli azurofilici.

### ***5.6.3 Effetto degli inibitori del trasporto di ioni cloruro sulla degranulazione: analisi al microscopio elettronico a trasmissione***

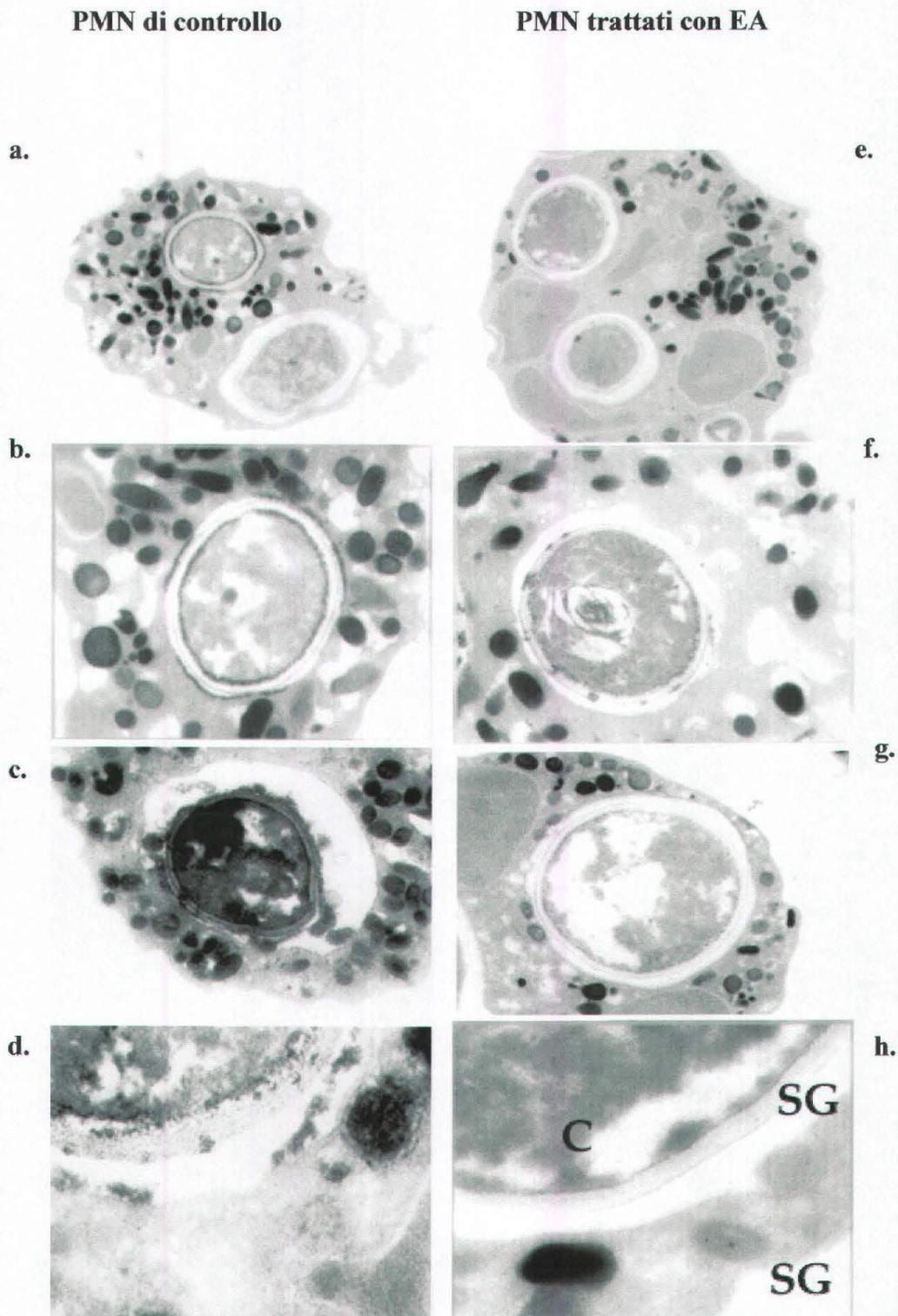
L'effetto degli inibitori del trasporto di cloruro sulla degranulazione indotta dall'ingestione di *C. albicans* è stato ulteriormente studiato, analizzando tale fenomeno con la microscopia elettronica a trasmissione.

I campioni sono stati preparati da cellule preincubate con EA, un'inibitore ad ampio spettro dei flussi di  $Cl^-$ , o con tampone di controllo e messe poi in contatto con le particelle fungine. I preparati per la microscopia elettronica sono stati successivamente allestiti secondo protocollo standard grazie alla collaborazione della dott.ssa Francesca Vita (Dipartimento di Fisiologia e Patologia, Univ. TS). L'osservazione dei preparati è stata effettuata con la collaborazione del sig. Claudio Gamboz (Centro Servizi Polivalenti di Ateneo, Settore Microscopia Elettronica) e della dott.ssa Maria Rosa Soranzo (Dipartimento di Fisiologia e Patologia, Univ. TS).

Nella Figura 5.10 sono rappresentate le immagini di neutrofilici incubati con *C. albicans* in assenza (a, b, c, d) ed in presenza di EA (e, f, g, h). Il pannello a mostra un neutrofilo che ha ingerito particelle fungine; in questa immagine è ben evidenziata la presenza di numerosi granuli attorno al fagosoma. I granuli azurofilici e specifici sono facilmente caratterizzabili in queste immagini in quanto differiscono sia per grandezza che per la colorazione citochimica per l'MPO: gli azurofilici sono più grandi e intensamente colorati mentre gli specifici sono più piccoli e meno colorati. Nei pannelli b, c e d sono rappresentati dei particolari del pannello a in cui sono ben evidenti le fusioni dei granuli con la membrana del fagosoma. I pannelli e, f, g e h mostrano lo

stesso evento in PMN trattati con EA. Confrontando queste immagini con quelle di controllo risulta evidente che la presenza dell'inibitore non altera l'ingestione delle particelle fungine da parte dei PMN. Si nota però come i granuli azurofilo appaiono dispersi nel citoplasma e non si fondono con il fagosoma. Guardando in particolare i pannelli g e h, si notano invece le fusioni dei granuli specifici con la membrana fagosomale.

I risultati finora riportati ci consentono quindi di affermare che diversi inibitori degli efflussi di ioni cloruro, a concentrazioni che non interferiscono con la fagocitosi di *C. albicans*, sono in grado di inibire in maniera coordinata i flussi di  $Cl^-$ , l'attività microbica e il rilascio di granuli azurofilo. Questi risultati sono coerenti con l'ipotesi che il meccanismo microbica MPO- $H_2O_2$ -alogenuro svolga un ruolo rilevante nell'attività candidacida dei PMN. Questa ipotesi è stata recentemente avvalorata da alcuni esperimenti, condotti nel nostro laboratorio. Infatti studiando l'attività candidacida in neutrofilo isolati da soggetti geneticamente carenti di MPO, è stata messa in evidenza una marcata riduzione dell'attività battericida nei confronti di *C. albicans* (Decleva E et al., 2005).



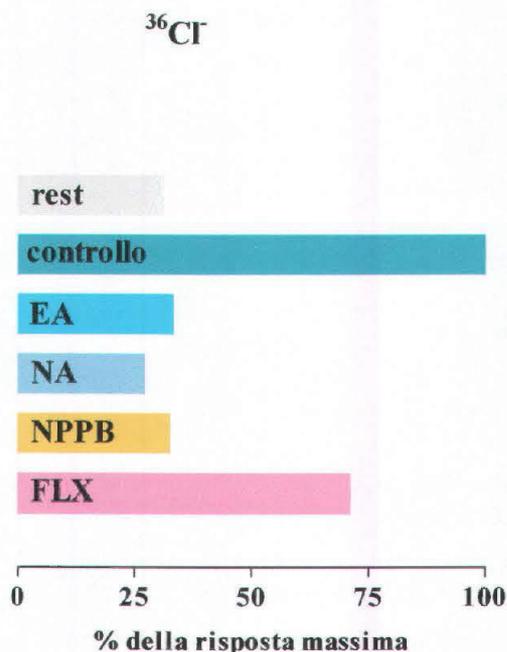
**Figura 5.10** Fagocitosi di *C. albicans* da parte di PMN: immagini al microscopio elettronico a trasmissione. I PMN sono stati incubati con *C. albicans* in rapporto di 1:3 in presenza o in assenza di EA 125  $\mu$ M e processati secondo le tecniche convenzionali utilizzate per la microscopia elettronica. Prima dell'inclusione le cellule sono state colorate con la reazione citochimica per le perossidasi in maniera da evidenziare i granuli azurofilici che contengono MPO. I pannelli a, b, c e d mostrano PMN incubati con *C. albicans* in assenza di inibitore. Nei pannelli e, f, g e h sono riportate le immagini di PMN preincubati con EA. GS sta per granuli specifici mentre C sta per candida. Ingrandimenti: a, e (3.500x); b, f (4.400x); c, g (5.600x); d, h (11.000x).

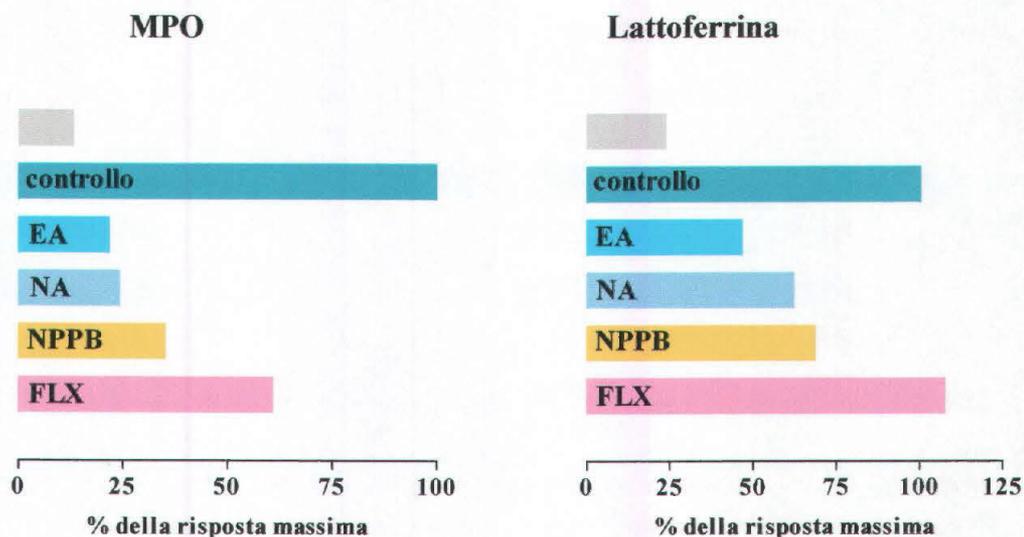
## 5.7 Effetto degli inibitori dei movimenti di ioni cloruro sulla degranulazione di PMN stimolati con stimoli solubili

Il fatto di aver individuato una correlazione tra efflussi di ioni cloruro e degranulazione in PMN stimolati con *C. albicans*, ci ha indotto a verificare se questa correlazione persisteva anche con stimoli di diversa natura, per esempio il peptide chemiotattico N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP).

### 5.7.1 Correlazione tra efflussi di ioni cloruro e degranulazione in PMN stimolati con fMLP

La valutazione degli efflussi di ioni cloruro e del rilascio di sostanze granulari (MPO per i granuli azurofilo e lattoferrina per gli specifici) in presenza od in assenza di alcuni inibitori degli efflussi di  $\text{Cl}^-$  sono stati condotti in parallelo su cellule stimolate con fMLP. Dai risultati raccolti nei grafici della Figura 5.11 si può notare come sostanze efficaci nell'inibire gli efflussi di  $\text{Cl}^-$  si dimostravano altrettanto efficaci nell'inibire il rilascio dei granuli azurofilo. Anche in questo modello sperimentale, il rilascio dei granuli specifici era meno influenzato dagli inibitori del trasporto di cloruro.





**Figura 5.11** Analisi dell'effetto degli inibitori degli efflussi di ioni cloruro sui movimenti di ioni cloruro e sul rilascio di componenti granulari (MPO e Lattoferrina) in PMN stimolati con *fMLP*. Le metodiche usate sono descritte rispettivamente nei paragrafi 3.7e 3.9.1. Prima di aggiungere lo stimolo i neutrofili sono stati incubati con gli inibitori per 15' a 37°C. MPO: mieloperossidasi; lattoferrina; EA: acido etacrिनico; NA: acido niflumico; NPPB: nitrofenilpropilaminobenzoato; FLX: fluoxetina

I dati fin ora ottenuti si sono dimostrati coerenti con alcuni risultati pubblicati tempo addietro in cui era stato dimostrato che inibitore di flussi anionici erano in grado di inibire la degranolazione dei PMN (Korchk H. M. et al., 1980; Smith R. J. et al, 1984; Vedder N. B. and Harlan J.M. 1988). In quel momento, però, la natura dell'anione e la direzione dei flussi non erano state individuate. I nostri risultati forniscono maggiori dettigli in proposito ma, fino ad ora, lasciano ancora aperto il seguente interrogativo: "Come agiscono i flussi di cloruro nella regolazione della degranolazione?". I risultati che verranno presentati nel prossimo paragrafo tentano di dare una possibile interpretazione della relazione causale tra flussi di cloruro e rilascio di componenti granulari.

### 5.8 Correlazione tra movimenti di ioni cloruro e variazioni dei livelli citoplasmatici di $Ca^{2+}$

E' noto che il rilascio di sostanze granulari nei PMN è correlato all'incremento di  $Ca^{2+}$ <sub>i</sub> e che esiste una precisa gerarchia nel rilascio dei diversi tipi di granuli in base alla concentrazione di  $Ca^{2+}$ <sub>i</sub> (Sengelow et al. 1993; Lew P.D. et al. 1986). Ci siamo quindi

prefissati di capire se potesse esistere una correlazione tra efflussi di cloruro, movimenti di  $\text{Ca}^{2+}$  e rilascio di granuli.

Per prima cosa abbiamo voluto verificare se nelle nostre condizioni sperimentali vi fosse una correlazione tra movimenti di ioni cloruro, variazioni della concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare e rilascio dei granuli citoplasmatici. Per fare ciò abbiamo allestito delle prove per valutare in parallelo queste risposte funzionali in PMN stimolati con *C. albicans*, in presenza di tampone di controllo o BAPTA/EGTA.

Dopo il caricamento con il Fura 2-AM e/o  $^{36}\text{Cl}^-$ , avvenuto secondo i protocolli descritti nei paragrafi 3.10 e 3.9 del capitolo Materiali e Metodi, i PMN venivano divisi in 2 aliquote per procedere con un'ulteriore incubazione per 30 minuti a  $37^\circ\text{C}$  in presenza di tampone di controllo (Hepes) o di tampone addizionato di BAPTA-AM (10  $\mu\text{M}$  finale). Alla fine dell'incubazione, che permette al BAPTA-AM di accumularsi nel citoplasma e di chelare il  $\text{Ca}^{2+}$ , le due provette venivano centrifugate a  $250 \times g$  per 7 minuti ed i pellet risospesi in tampone Hepes-ioni (addizionato  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgCl}_2$  0,5 mM finali) alla concentrazione finale di  $2,5 \times 10^6/\text{ml}$ . L'EGTA (1 mM finale) veniva aggiunto ai campioni e lasciato agire per alcuni minuti prima dello stimolo.

I risultati riassunti nella Tabella V indicano che il trattamento con BAPTA-EGTA abrogava, come previsto, l'aumento del calcio citoplasmatico. Lo stesso trattamento provocava una marcata inibizione della degranulazione ma lasciava praticamente inalterati gli efflussi di cloruro.

<i>PMN</i>	$\text{Ca}^{2+}$ (UAF)	Efflussi di $^{36}\text{Cl}^-$ (%)	MPO (% attività residua)
<i>resting</i>	2	22.6	nd
<i>controllo</i>	30	58.2	100
<i>BAPTA-EGTA</i>	0	59.3	16

**Tabella V** Correlazione tra flussi di  $\text{Cl}^-$ , aumento di  $\text{Ca}^{2+}$ , e degranulazione in PMN stimolati con *C. albicans*. I dati riportati sono il risultato di un esperimento rappresentativo di valutazione delle 3 risposte funzionali effettuate utilizzando i protocolli descritti nei paragrafi 3.7, 3.9.1 e 3.10.

### **5.8.1 Effetto degli inibitori del trasporto di cloruro sulle variazioni dei livelli citoplasmatici di calcio in cellule fagocitanti**

Utilizzando alcuni inibitori degli efflussi di  $\text{Cl}^-$  siamo andati a indagare se vi poteva essere una correlazione tra movimenti di ioni cloruro e variazioni del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare, visto che entrambi questi eventi sono in grado di modulare il rilascio di sostanze granulari nei PMN. Per questa serie di esperimenti siamo andati a valutare in parallelo gli efflussi di  $\text{Cl}^-$  e le variazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmatico prelevando dalla stessa provetta le aliquote di campioni da analizzare con le due metodiche, in modo da avere una correlazione diretta dei risultati ottenuti.

Le misure delle variazioni di  $\text{Ca}^{2+}_i$  sono state condotte allo spettrofotofluorimetro utilizzando come sonda fluorescente Fura-2AM, metodica descritta nel paragrafo 3.10 del capitolo Materiali e Metodi. L'impiego di questa sonda ci ha costretti a non poter utilizzare alcuni inibitori utilizzati negli esperimenti precedenti (DIDS, 9-AC, NA e NPPB) in quanto tali sostanze interferivano marcatamente con la fluorescenza del Fura-2AM. Per risolvere questo problema abbiamo cercato di sfruttare un'altra sonda per il  $\text{Ca}^{2+}_i$ , il Calcium Crimson, la quale, avendo un diverso spettro di emissione ed eccitazione, non avrebbe dovuto più causare problemi con gli inibitori usati. In questo caso però non siamo riusciti a mettere a punto il protocollo per il caricamento della sonda nei PMN e quindi abbiamo dovuto abbandonare questa via alternativa.

Gli esperimenti successivi sono stati perciò condotti utilizzando due inibitori che non causavano interferenza nelle letture: l'EA ed la FLX.

La preparazione delle cellule, per poter effettuare parallelamente la misurazione del  $\text{Cl}^-$  e del  $\text{Ca}^{2+}$ , richiede due caricamenti successivi sempre a  $37^\circ\text{C}$ : il primo per 1 ora e mezza in presenza solamente di  $^{36}\text{Cl}^-$  ed il secondo per ulteriori 40 minuti in presenza sia di  $^{36}\text{Cl}^-$  sia di Fura-2AM. Alla fine delle incubazioni le cellule vengono lavate a  $250 \times g$  per 7 minuti e poi risospese in tampone-Hepes addizionato di  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{Mg}_2\text{Cl}_2$  1mM finali. A questo punto i PMN sono pronti per le prove funzionali con gli inibitori.

Per studiare l'effetto degli inibitori sui movimenti di  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$  in PMN stimolati con *C. albicans* abbiamo sottoposto le cellule dapprima ad un incubazione di 10 minuti con gli inibitori o con il tampone di controllo e poi ad un ulteriore incubazioni di 10

minuti con le candide, in cuvette a 37°C; durante i quali sono state misurate le variazioni  $\text{Ca}^{2+}$ . Alla fine delle incubazione i campioni sono stati trattati secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.9 del capitolo Materiali e Metodi per la valutazione degli efflussi di  $\text{Cl}^-$ .

La Figura 5.12 mostra che entrambi gli inibitori degli efflussi di  $\text{Cl}^-$  esercitano, un marcato effetto inibitorio non solo sui movimenti di cloruro ma anche sull'innalzamento del  $\text{Ca}^{2+}$ .

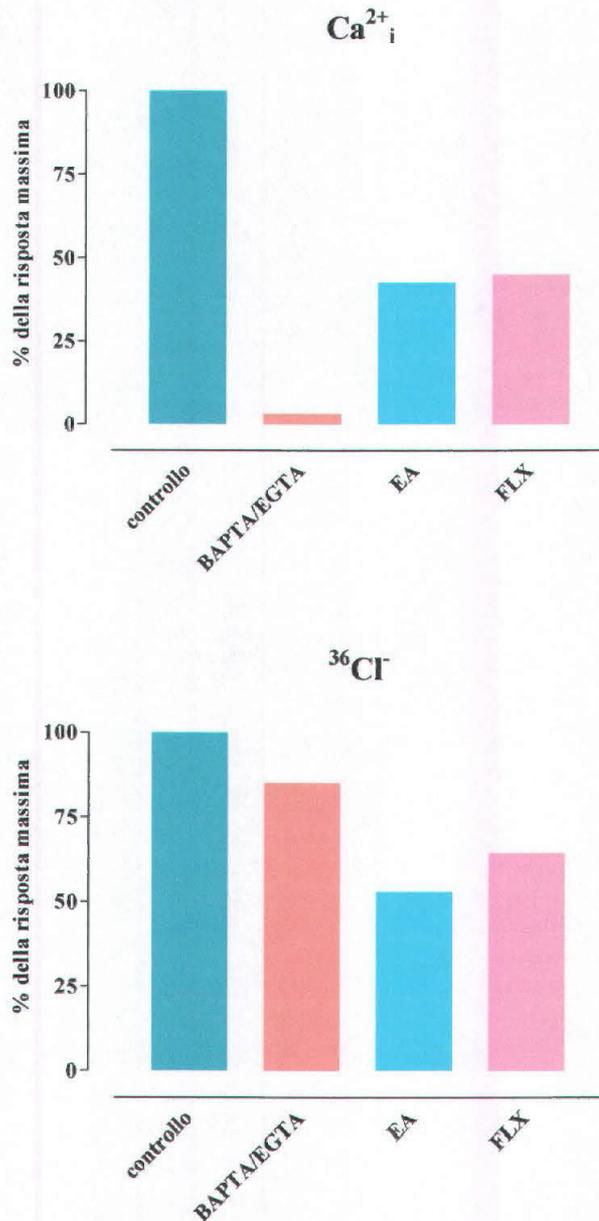


Figura 5.12 Correlazione tra variazioni di  $\text{Ca}^{2+}_i$  e movimenti di  $^{36}\text{Cl}^-$  in PMN stimolati con *C. albicans*. Prove con EA, FLX e BAPTA-EGTA.

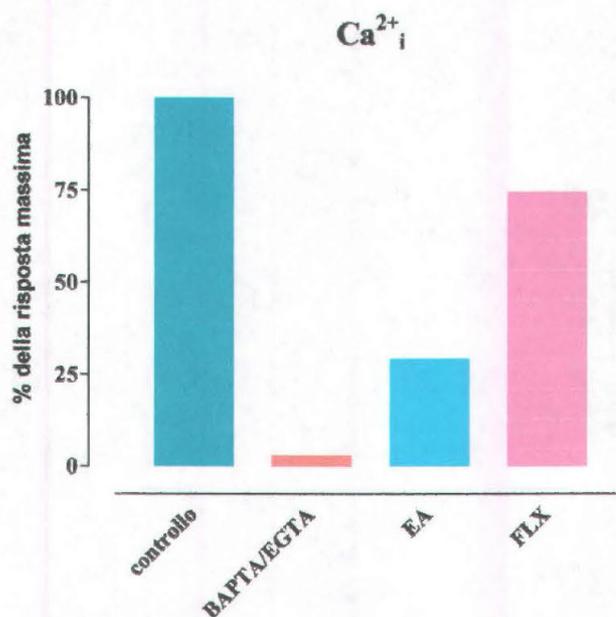
### 5.8.2 Correlazione tra movimenti di ioni cloruro e variazioni della concentrazione di calcio citoplasmatico in PMN stimolati con fMLP

L'attivazione dei recettori per l'fMLP determina un rapido aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare, che avviene in pochi secondi. Essendo quindi il  $\text{Ca}^{2+}$  un secondo messaggero importante per la trasduzione del segnale del fMLP siamo andati anche in questo caso a valutare l'effetto degli inibitori del trasporto di  $\text{Cl}^-$  sulle variazioni di  $\text{Ca}^{2+}_i$  e dei chelanti del  $\text{Ca}^{2+}$  sugli efflussi.

La Figura 5.13 mostra i risultati di una serie di esperimenti di misurazione delle variazioni di calcio citoplasmatico in assenza o in presenza degli inibitori EA e FLX o di BAPTA-EGTA. Come si può vedere in Figura 5.13 risulta evidente che, stimolando i PMN con fMLP, si assiste ad un cospicuo aumento di calcio citoplasmatico nei campioni di controllo mentre nei campioni trattati con i due inibitori si evidenzia una marcata riduzione del  $\text{Ca}^{2+}_i$  nelle cellule trattate con EA. Diversamente da quanto succedeva con le candide, FLX si rivela meno efficace nel ridurre sia l'aumento di calcio citoplasmatico sia gli efflussi di  $\text{Cl}^-$ .

Questi risultati suggeriscono che, anche in presenza di uno stimolo di diversa natura i movimenti di ioni cloruro sono coinvolti nella modulazione delle variazioni di calcio intracellulare.

Nelle prove con BAPTA-EGTA si dimostra invece come, anche con questo stimolo, non ci sia dipendenza degli efflussi di  $\text{Cl}^-$  dalle variazioni del  $\text{Ca}^{2+}_i$ .



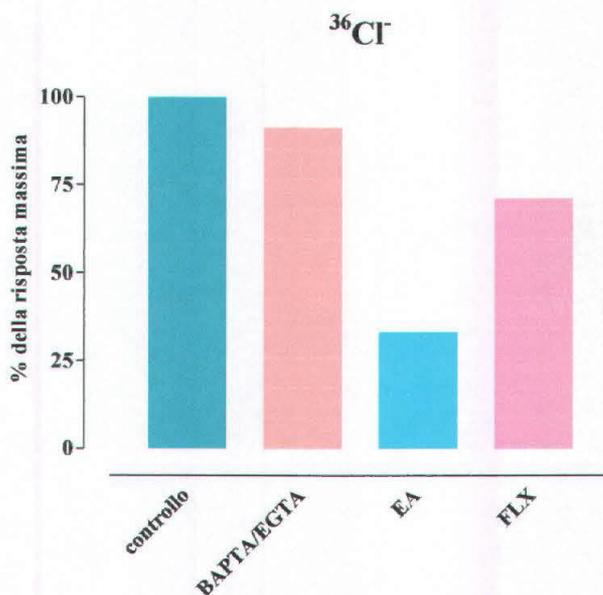


Figura 5.13 Correlazione tra variazioni di  $\text{Ca}^{2+}_i$  e movimenti di  $^{36}\text{Cl}^-$  in PMN stimolati con fMLP. Prove con EA, FLX e BAPTA-EGTA.

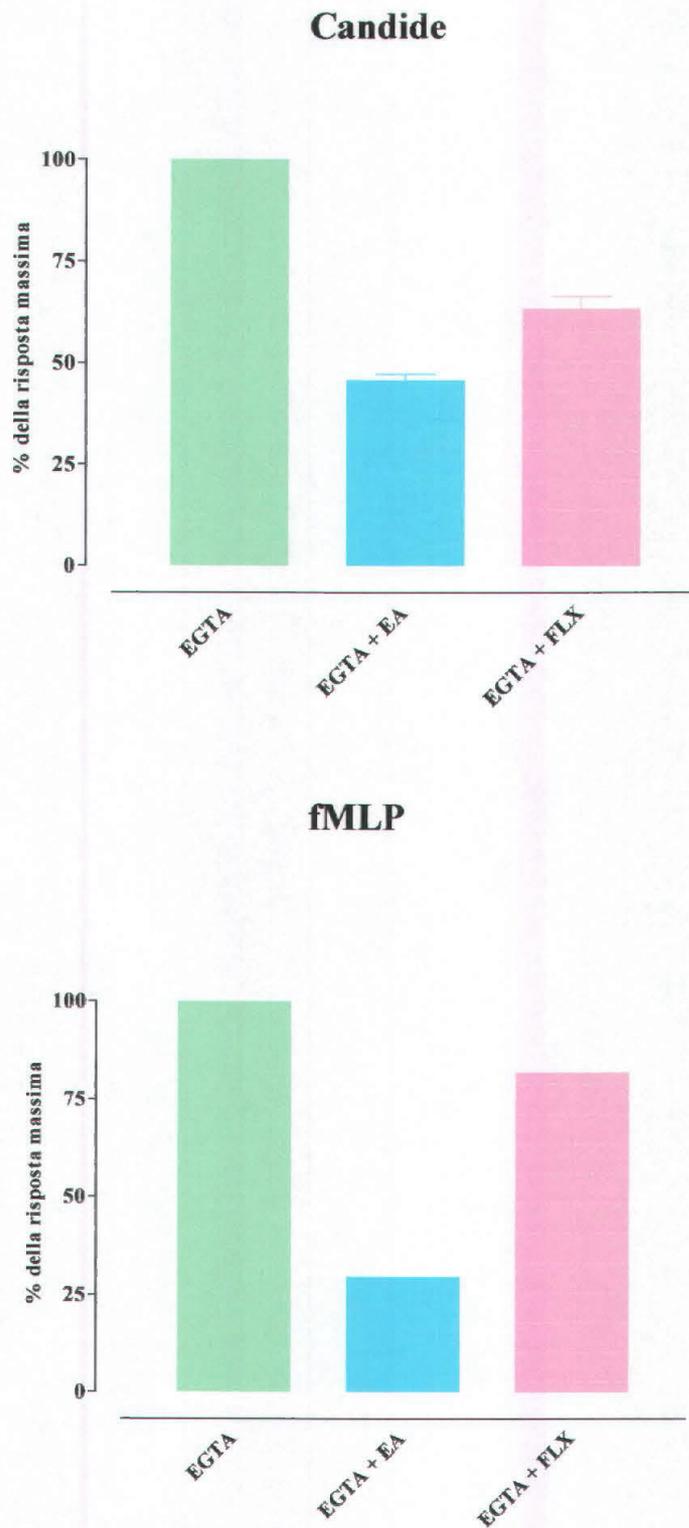
### 5.9 Effetto degli inibitori dei movimenti di ioni cloruro sul rilascio di calcio dagli stores intracellulari in PMN stimolati con *C. albicans* ed fMLP

Considerando che il rilascio di calcio dagli stores intracellulari rappresenta un evento precoce per entrambi gli stimoli utilizzati, cioè *C. albicans* ed fMLP, abbiamo voluto verificare se gli efflussi di ioni cloruro erano in grado di modulare questo evento. Per fare ciò siamo andati a valutare i movimenti di  $\text{Ca}^{2+}_i$  in PMN incubati con EGTA e con gli inibitori (EA, FLX).

Nella Figura 5.14 si nota che anche in questo caso entrambe le sostanze esercitano una marcata inibizione sul rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  dagli stores intracellulari in presenza dello stimolo particolato. Va anche rilevato che l'EA ha un evidente effetto sul rilascio di calcio stimolato da fMLP, mentre FLX esercita un'inibizione decisamente inferiore.

Questi risultati propongono un ruolo dei movimenti di ioni cloruro nella modulazione del rilascio di calcio dagli stores intracellulari. Inoltre, dato che FLX risulta più efficace nell'inibire i movimenti di calcio cloruro-dipendenti indotti da candida piuttosto che quelli da fMLP, è plausibile ipotizzare che i movimenti di cloruro

stimolati dalla fagocitosi siano mediati da un meccanismo almeno in parte diverso da quello attivato dallo stimolo solubile.



**Figura 5.14** Effetto degli inibitori del trasporto di ioni cloruro sul rilascio di calcio dagli stores intracellulari in PMN stimolati con *C. albicans* e fMLP. Inibitori usati EA ed FLX.

### 5.10 Modulazione dei movimenti di ioni cloruro e delle variazioni del calcio intracellulare in PMN stimolati con dosi crescenti di fMLP

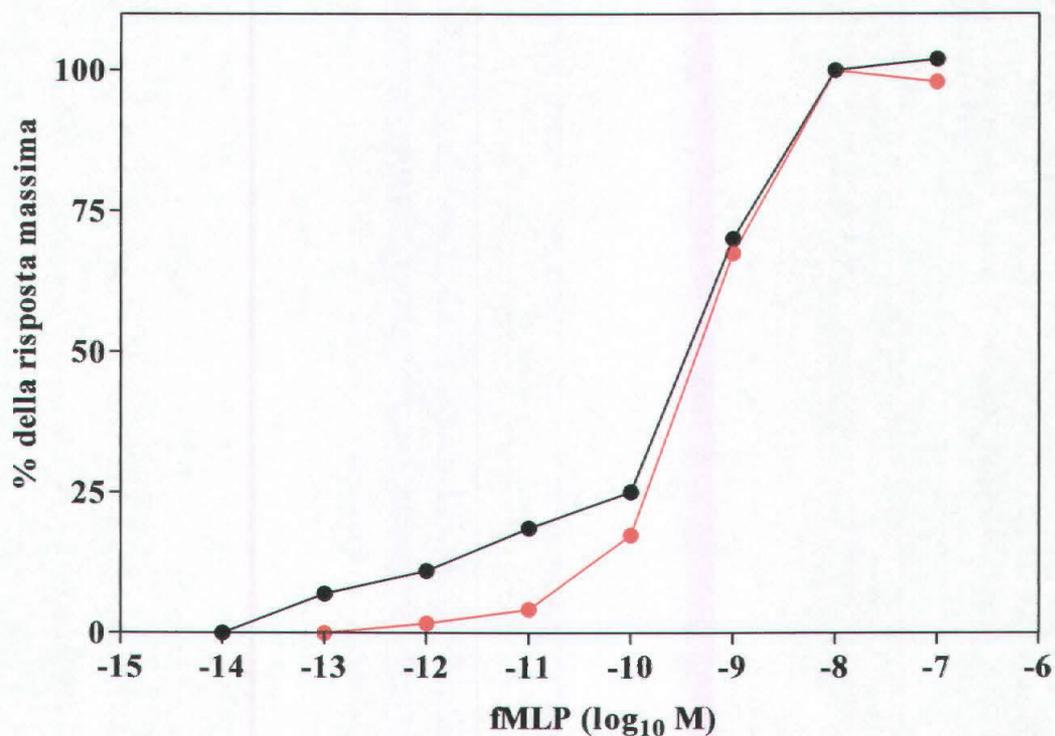
Già da alcuni anni si sta cercando di delineare quale sia la relazione tra efflussi di ioni cloruro e variazioni del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmatico nei leucociti. Dati di letteratura dimostrano che:

- gli efflussi di  $\text{Cl}^-$  e l'aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmatico sono eventi molto rapidi: molti agonisti solubili infatti sono in grado di attivare efflussi di ioni cloruro e movimenti di  $\text{Ca}^{2+}$  entro un minuto dalla loro applicazione ai PMN (Shimizu Y. et al, 1993);
- alcuni agonisti, utilizzati a concentrazioni che non inducono un aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  registrabile, sono in grado di attivare i movimenti di  $\text{Cl}^-$  (Shimizu Y. et al, 1993);
- certi agonisti che non inducono alcuna variazione di  $\text{Ca}^{2+}_i$ , o lo fanno solo limitatamente, sono capaci di attivare un'intenso efflusso di  $\text{Cl}^-$  (Shimizu Y. et al, 1993);
- alcuni inibitori del trasporto di  $\text{Cl}^-$ , che inibiscono i movimenti di ioni cloruro in linfociti T, inibiscono anche l'aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico e la conseguente attivazione cellulare (Phipps D. J., 1996).

Queste notizie raccolte in letteratura, accanto ai risultati da noi ottenuti, sembrano indicare che i movimenti di ioni cloruro possono essere indipendenti dall'aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico. A conferma di questa ipotesi giungono i dati di una serie di esperimenti da noi condotti appunto per verificare l'interdipendenza dei due eventi. Per fare ciò siamo andati a valutare in parallelo gli efflussi di  $\text{Cl}^-$  e le variazioni di  $\text{Ca}^{2+}_i$  in PMN stimolati con dosi crescenti di fMLP. La scelta dello stimolo solubile è stata suggerita dal fatto che la risposta cellulare risultava più facilmente modulabile rispetto a quella indotta dallo stimolo particolato.

I dati raccolti nel grafico della Figura 5.15 sono espressi come percentuale della risposta massima ottenuta utilizzando la concentrazione più elevata di fMLP in termini sia di efflussi di cloruro che di aumento del  $\text{Ca}^{2+}_i$ . Dal grafico si può notare come, alle concentrazioni più basse utilizzate ( $10^{-13}$ -  $10^{-11}$  M), si misurino efflussi di cloruro mentre la risposta in termini di aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  è assente o molto inferiore a quella relativa all'efflusso di  $\text{Cl}^-$ .

Questi risultati supportano l'idea che efflussi di  $\text{Cl}^-$  possono venir innescati anche in assenza di movimenti di  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figura 5.15** Modulazione dei movimenti di ioni cloruro e delle variazioni del calcio intracellulare in PMN stimolati con dosi crescenti di fMLP. In questi esperimenti sono stati valutati in parallelo gli efflussi di  $^{36}\text{Cl}^-$  e le variazioni di  $\text{Ca}^{2+}_i$  in PMN stimolati con dosi crescenti di fMLP. Nel grafico viene indicato con (●) i valori corrispondenti agli efflussi di cloruro e con (◐) i valori corrispondenti ai livelli di calcio citoplasmatico.

## **5.11 Studi sui segnali intracellulari coinvolti nell'attivazione dei movimenti di cloruro in PMN stimolati con fMLP e *C. albicans***

Dopo aver dimostrato che gli efflussi di ioni cloruro (a) sono in grado di modulare i livelli di calcio citoplasmatico e (b) sono indipendenti dal calcio per la loro attivazione, ci siamo proposti di analizzare i vari passaggi delle cascate di segnalazione che portano al rilascio di calcio dagli stores intracellulari per cercare di capire a quale livello delle vie di traduzione del segnale il  $\text{Cl}^-$  intervenisse a modulare il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  e, conseguentemente, la degranulazione.

### **5.11.1 Vie di segnalazione attivate dal recettore per l'fMLP**

L'fMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina) è un peptide chemiotattico derivante da *Escherichia Coli* costituito da prodotti di degradazione delle proteine batteriche. Potente chemioattrattante delle cellule polimorfonucleate, si lega a recettori specifici di membrana innescando così segnali intracellulari, mediati dalle vie sensibili alla tossina per tossica, che attivano molte risposte dei PMN: per es., cambiamento dell'espressione di molecole di adesione e aumento della produzione di anione superossido e della degranulazione.

Il recettore per l'fMLP appartiene alla famiglia dei recettori seven-transmembran-domain (7TMD) accoppiati a proteine G. Questi recettori 7TMD sono proteine integrali di membrana comprendenti sette regioni ad  $\alpha$ -elica composte ciascuna da 20-28 aminoacidi. Queste regioni attraversano sette volte la membrana cellulare e sono caratterizzate una sequenza amminoacidica molto simile in recettori diversi appartenenti a questa classe. La localizzazione e la struttura dei siti di legame per la molecola segnale non sono ancora noti con certezza, mentre è noto che la zona intracellulare compresa tra la quinta e la sesta elica è caratteristica per ciascun recettore e contiene i siti di legame per una proteina localizzata sulla faccia citosolica della membrana, chiamata proteina G. La proteina G è costituita da tre catene peptidiche  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . In condizioni di riposo, la subunità  $\alpha$  lega una molecola di GDP e le subunità  $\beta$  e  $\gamma$  rimangono associate alla subunità  $\alpha$ . Il rilascio di GDP è seguito dal legame del GTP, che causa la dissociazione dell'eterodimero nei suoi derivati  $\alpha$  e il dimero  $\beta\gamma$ . L'attività

GTPasica della subunità  $\alpha$  determina la durata di questo stato di attivazione (dissociato) della G-protein. L'idrolisi del GTP a GDP permette la riassociazione di  $\alpha$  con il dimero  $\beta\gamma$ : la G-protein è così pronta per un altro ciclo di attivazione. Le subunità  $\alpha$  e  $\beta\gamma$  possono regolare gli effettori delle G-protein in modo selettivo ed i due segnali possono essere indipendenti, sinergici o antagonisti. L'attività GTPasica della subunità  $G\alpha$  e la sua associazione con  $\beta\gamma$  può essere inoltre regolata da proteine accessorie (A. J. Morrison and C. C. Malbon, 1999).

Esistono diverse classi di proteine G che differiscono per (a) sequenza aminoacidica, (b) recettore con cui interagiscono, (c) effettore che comandano. Tra gli effettori dell'attivazione delle proteine G ricordiamo l'adenilato ciclasi, la fosfolipasi C (PLC), l'IP3-chinasi e la fosfolipasi  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>). In particolare l'attivazione delle PLC è uno dei primi eventi della risposta cellulare alla stimolazione da parte di un gran numero di segnali extracellulari. Grazie al loro intervento la risposta cellulare si separa in due vie, regolate dai secondi messaggeri DAG e IP<sub>3</sub> (Figura 5.16).

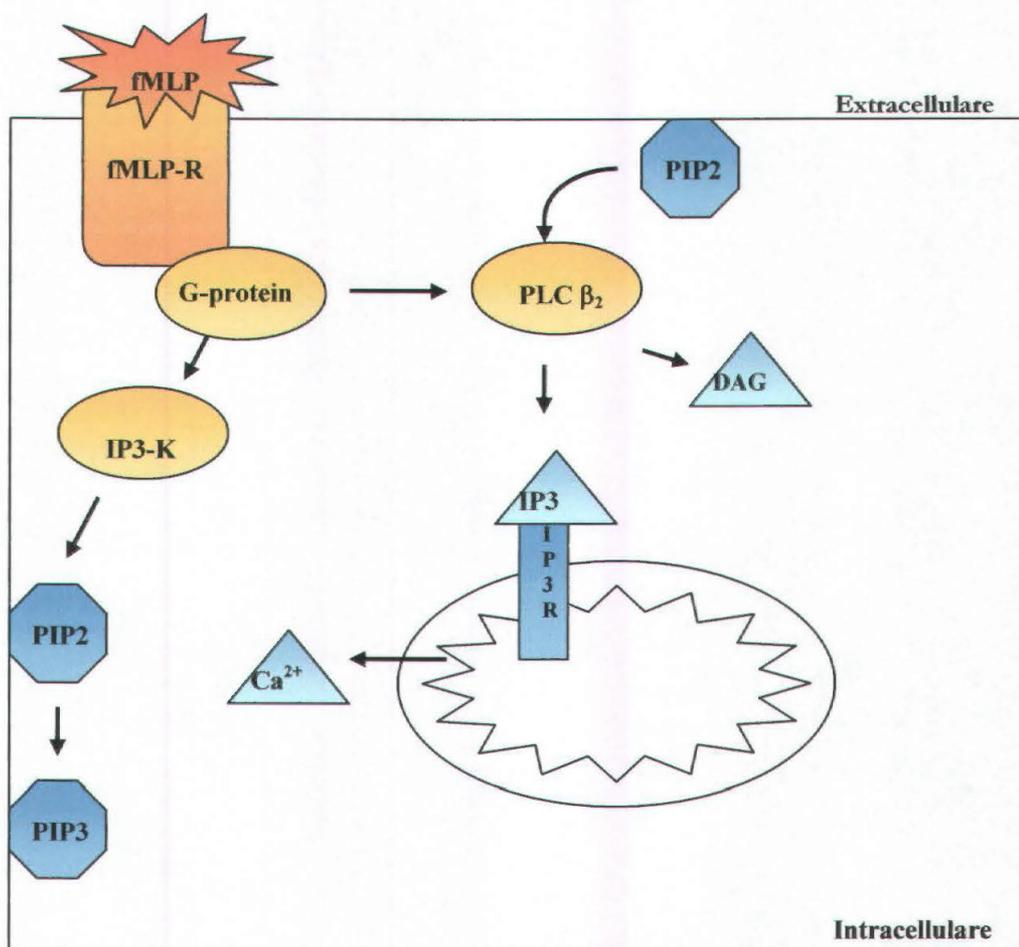


Figura 5.16 Alcune vie di segnalazione attivate dal recettore per l'fMLP.

I recettori per l'fMLP presenti nei PMN sono accoppiati a G-protein della sottofamiglia  $G_i\alpha$ , cioè proteine G, sensibili alla tossina pertossica, che inibiscono l'attivazione della adenilato ciclasi. In recenti studi è stato messo in evidenza inoltre che questa sottoclasse  $G\alpha$ , contrariamente da quello che era noto in origine, è in grado di interagire con la fosfolipasi C  $\beta$ , enzima effettore della via di segnalazione, che attualmente si reputa essere regolato nei leucociti dalla subunità  $G\beta\gamma$  (Bokoch Gary M., 1995; Prossnitz E. R. et al., 1995).

### 5.11.2 Vie di segnalazione attivate dai recettori per le opsonine

Il riconoscimento e l'adesione alle particelle da fagocitare avviene grazie alla presenza di recettori specifici sulla membrana plasmatica dei PMN che sono in grado di riconoscere in maniera efficiente i microrganismi opsonizzati, cioè rivestiti da anticorpi e/o frammenti del complemento (opsonine). I recettori coinvolti nel processo di riconoscimento e adesione delle particelle fagocitabili sono infatti recettori che riconoscono la porzione Fc delle immunoglobuline G (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIIB) e i recettori per il fattore del complemento C3b (CR1 o CR3).

Tra questi recettori Fc $\gamma$ RIIA (CD32A) e CR3 sono i recettori funzionali della fagocitosi mentre CR1 e Fc $\gamma$ RIIIB (CD16B) sono dei co-recettori che facilitano la funzione del primo recettore.

#### 5.11.2a Recettore per l'Fc $\gamma$

I PMN umani sono gli unici che hanno espressi costitutivamente due isoforme atipiche di Fc $\gamma$ R: Fc $\gamma$ RIIA o CD32A, che è il più studiato tra i due, ed Fc $\gamma$ RIIIB o CD16B.

L'attivazione del recettore CD32A, conseguente al legame con le IgG, determina la fosforilazione della sua porzione citoplasmatica ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), da parte di tirosin-chinasi della famiglia Src. L'azione di Src causa l'esposizione di domini SH2 per il legame di ITAMs con un'altra classe di tirosin-chinasi, denominate Syk, le quali sono in grado di attivare varie vie di trasmissione del segnale che coinvolgono IP3-chinasi, proteine Rho e fosfolipasi Cy (PLC $\gamma$ ) (Chuang F. Y. S. et al., 2000; Lofgren R. et al., 1999; Jeffrey C. et al., 1998) (Figura 5.17).

Il recettore CD16 appartiene alla classe di recettori "GPI-anchored", che sono cioè legati alla membrana via glicosil fosfatidil inositolo. Il CD16B è 10 volte più abbondante di CD32A sulla superficie dei PMN, e presenta maggiore affinità per le IgG rispetto a CD32A (*Chuang F. Y. S. et al., 2000*). La via di segnalazione di questo recettore è scarsamente conosciuta ma si presenta diversa da quella del CD32A. Nonostante le loro diversità, entrambi questi recettori, se attivati singolarmente, sono in grado di indurre modificazioni del  $Ca^{2+}$  intracellulare. La sinergia nell'attivazione di questi due recettori per Fc si riscontra proprio in questo transiente comune di calcio (*Jeffrey C. et al., 1998*). Un'altra ipotesi sulla sinergia di questi recettori è che il cross-linking dei recettori CD16B porti alla fosforilazione del CD32A causando in questo modo un aumento dell'attivazione delle tirosin-chinasi e quindi della PLC $\gamma$  (*Jeffrey C. et al., 1998*).

Studi condotti con genisteina (inibitore generico di tirosin-chinasi della famiglia Src), PP2 (inibitore generico di tirosin-chinasi della famiglia Syk) e wortmannina (inibitore delle IP3-chinasi) dimostrano inoltre che sia per il CD32A che per CD16B, Src, Syk e IP3K, sono fondamentali per la trasmissione del segnale (*Ebel C. et al., 2001*).

### **5.11.2b Recettore per il C3b**

Il recettore CR3 appartiene alla superfamiglia delle integrine ed in particolare alla sottofamiglia  $\alpha_M\beta_2$ . Ciascuna integrina è un eterodimero composto da due subunità:  $\alpha$  e  $\beta$ . Entrambe le subunità  $\alpha$  e  $\beta$  delle integrine sono glicoproteine transmembrana con un ampio dominio extracitoplasmatico, una regione transmembrana ed una corta porzione intracitoplasmatica. Il sito di legame delle integrine è localizzato nella regione N-terminale delle catene  $\alpha$  e  $\beta$ . La porzione critica per il legame è rappresentata da una regione di ~ 100 a.a. della catena  $\alpha$  che risulta altamente conservata e da parte del sito di legame ai cationi bivalenti. Cationi bivalenti come  $Ca^{2+}$  ed  $Mg^{2+}$  sono necessari per l'associazione delle catene  $\alpha$  e  $\beta$  e per il legame dell'integrina completa con il proprio ligando (*Ross G. D. et al., 1992; Fryer D. R. et al. 1988; Stewart M. P. et al., 1998; Hogg N. et al, 1993*).

Mentre la regione extracellulare delle integrine lega il ligando, il dominio intracitoplasmatico è deputato alla traduzione del segnale. Essendo sprovvista di attività

enzimatica intrinseca nella porzione intracitoplasmatica, le integrine trasducono i segnali grazie all'associazione con adattatori e chinasi prossimali alla membrana a loro volta in grado di attivare famiglie di chinasi citosoliche quali protein chinasi C, PLC, small GTP-binding protein delle famiglie Ras e Rho, MAP o ERK chinasi (Figura 5.17).

Anche in questo caso una delle conseguenze dell'attivazione del recettore, da parte del ligando specifico, è l'attivazione delle PLC $\gamma$  con conseguente aumento dei livelli di calcio intracellulare (Jaconi M. E. E. et al., 1991; Ng-Sikorski et al., 1991; Walgoz B. et al., 1994).

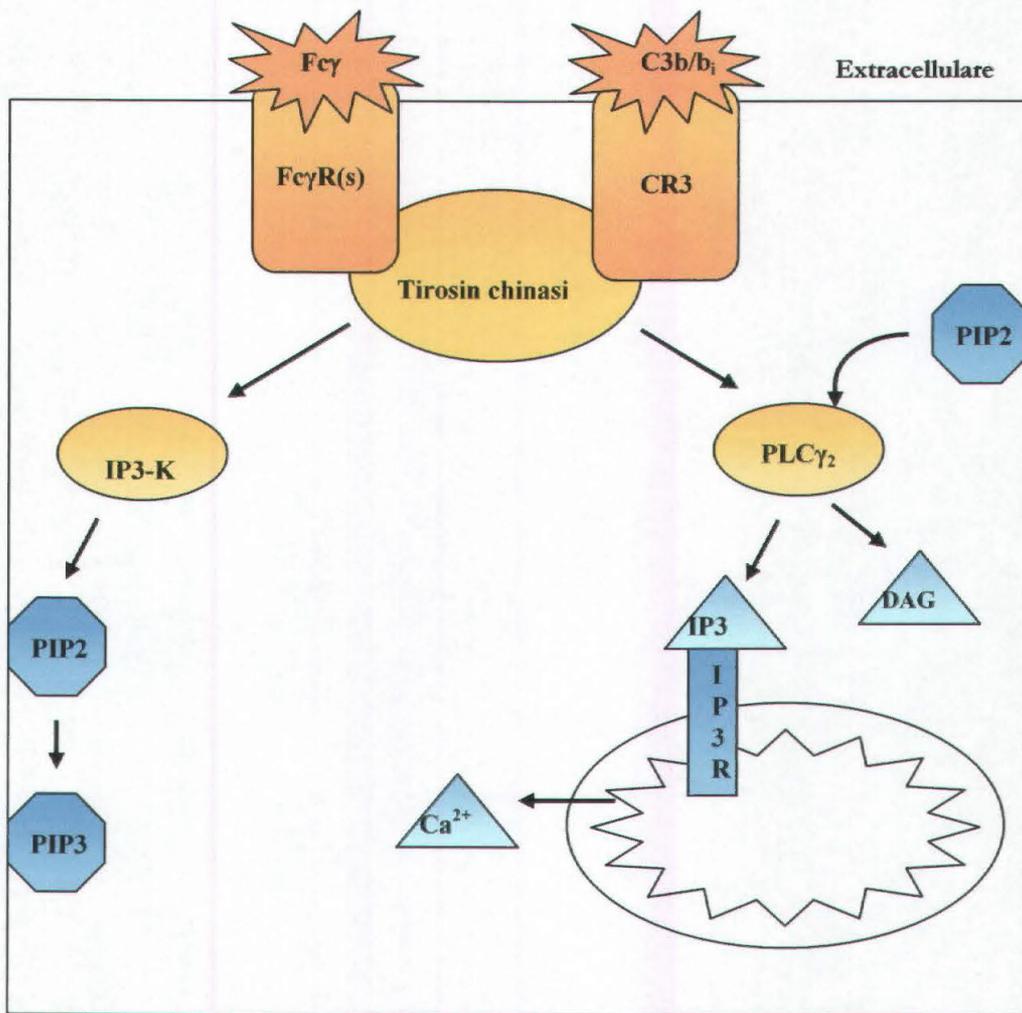


Figura 5.17 Alcune vie di segnalazione attivate dai recettori per le opsonine

### 5.11.3 Attivazione della fosfolipasi C

Punto comune nella traduzione del segnale dei recettori da noi considerati è l'attivazione delle PLC. Le PLC sono una famiglia di enzimi che catalizzano in modo selettivo l'idrolisi  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente dei fosfatidil-inositoli di membrana: fosfatidilinositolo (PI), fosfatidilinositolo 4-fosfato (PIP), e fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>). Grazie all'attivazione delle PLC, la risposta cellulare si separa in due vie, regolate dai secondi messaggeri DAG e IP<sub>3</sub>. Il DAG rimane localizzato sulla membrana, così da mediare l'associazione della proteinchinasi C (PKC) alla membrana cellulare, seguita dalla sua attivazione, mentre IP<sub>3</sub> è un messaggero intracellulare citoplasmatico, che interagisce con il corrispondente recettore del reticolo endoplasmatico liscio causando la liberazione del  $\text{Ca}^{2+}$  immagazzinato e, quindi, l'innalzamento della concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare.

Il calcio intracellulare oltre a promuovere diverse risposte cellulari, promuove anche l'ingresso di calcio extracellulare attraverso dei canali, detti store-operated channels (SOCs). L'aumento del calcio intracellulare induce il trasferimento della PKC dal citosol alla membrana, ove viene attivata dal DAG. L'aumento citosolico del  $\text{Ca}^{2+}$  è un fenomeno transiente perchè le pompe ATPasiche localizzate sulla membrana plasmatica e sulla membrana dell'ER trasportano attivamente gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  dal citosol all'esterno della cellula e nel lume dell'ER. Inoltre, nel giro di pochi secondi, IP<sub>3</sub> viene idrolizzato ad inositol 1,4-bisfosfato, molecola incapace di stimolare la liberazione del calcio (Figura 5.18).

Ricordiamo inoltre che esistono diversi tipi di PLC, nel nostro caso parleremo solo della PLC $\beta_2$  e della PLC $\gamma_2$ , specifiche dei PMN. L'attivazione delle PLC $\beta$  è avviata dai recettori 7TMD accoppiati alle proteine G eterotrimeriche mentre le PLC $\gamma$  possiedono domini SH2 (Src homology 2) che sono attivati dalla fosforilazione in tirosina da parte di tirosinchinasi recettoriali e non recettoriali (per es. Src).

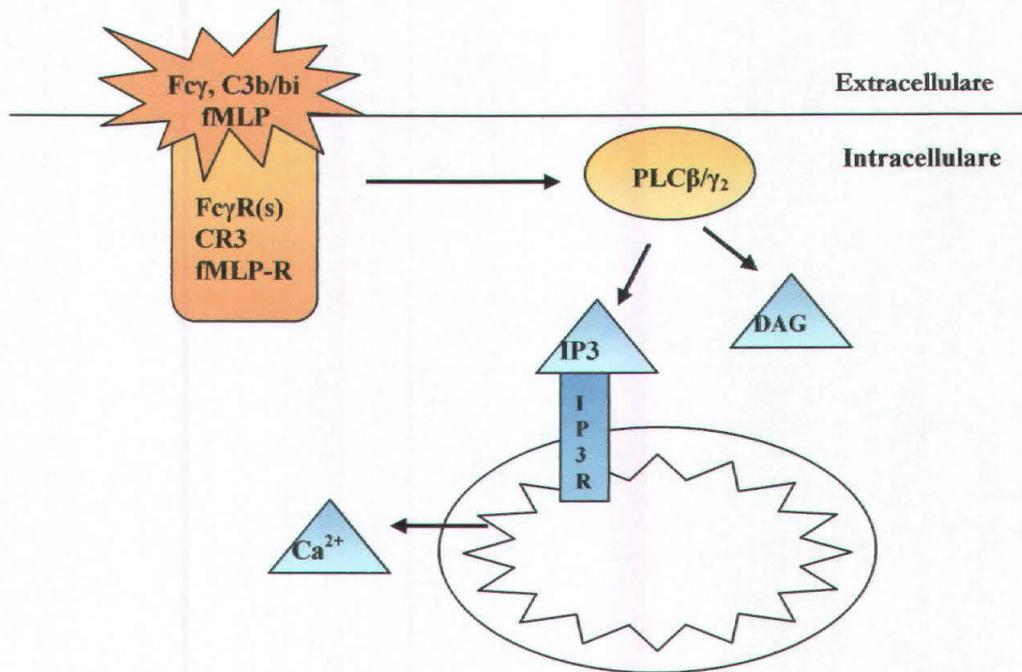


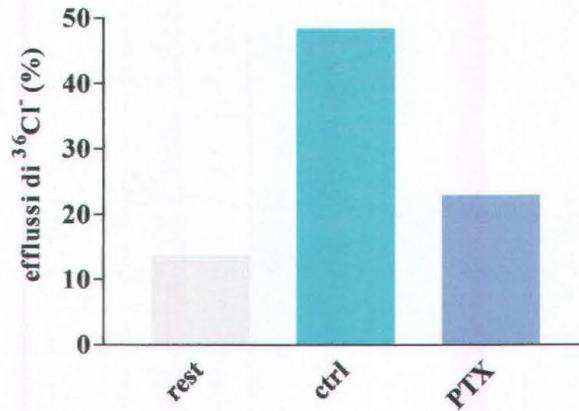
Figura 5.18 Attivazione della fosfolipasi C

## 5.12 Effetto di inibitori delle vie di segnalazione intracellulare sull'attivazione degli efflussi di cloruro

### 5.12.1 Effetto delle tossina pertossica sugli efflussi di Cl

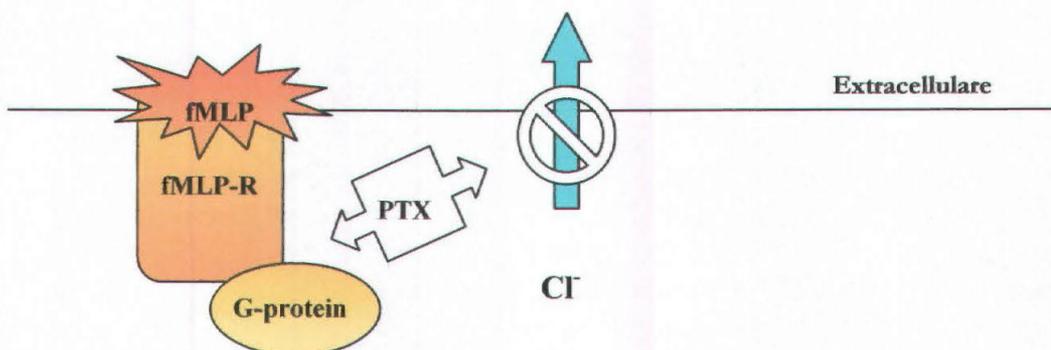
La tossina pertossica è un noto inibitore dei recettori accoppiati a proteine G inibitrici; essa agisce legando l'ADP-ribosio a  $G_{i\alpha}$ : in questo modo il complesso  $G_i$  è impedito nell'interagire con i recettori, e conseguentemente, non è capace di inibire l'adenilato ciclasi in risposta all'attivazione del recettore.

In questa serie di esperimenti i PMN sono stati incubati per 3 ore a 37°C con la tossina pertossica prima di essere sottoposti a stimolazione con fMLP. La metodica utilizzata per la valutazione degli efflussi misura i movimenti di  $^{36}\text{Cl}^-$  secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.9.1 del capitolo Materiali e Metodi. Nella Figura 5.19 possiamo vedere come in presenza di tossina della pertosse vi sia una forte riduzione degli efflussi di  $\text{Cl}^-$ .



**Figura 5.19** Effetto delle tossina pertossica sugli efflussi di  $\text{Cl}^-$ . I PMN sono stati caricati con  $^{36}\text{Cl}^-$  secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.9.1 e in cubati con la tossina pertossica (PTX) prima di essere sottoposti alle prove funzionali. I dati qui rappresentati sono i risultati di un esperimento rappresentativo nel quale i PMN sono stati stimolati con fMLP:

Questi risultati dimostrano per la prima volta che gli efflussi di ioni cloruro stimolati da fMLP sono dipendenti da uno dei primissimi eventi conseguenti all'impegno del recettore per l'fMLP e cioè la dissociazione della subunità  $\alpha$  dall'eterodimero  $\beta\gamma$  (Figura 5.20).



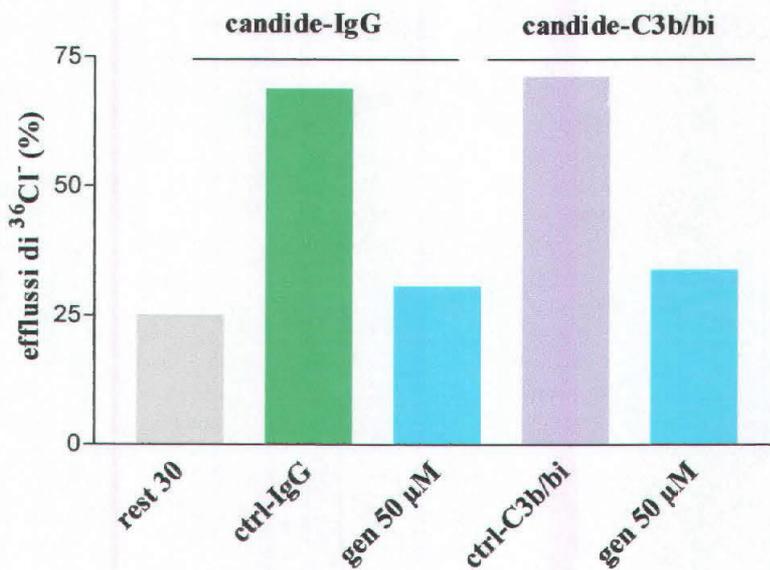
**Figura 5.20** Effetto delle tossina pertossica sugli efflussi di  $\text{Cl}^-$ .

### 5.12.2 Effetto dell'inibizione di tirosin-chinasi sugli efflussi di $Cl^-$

La genisteina è un inibitore generico di tirosin-chinasi della famiglia Src, quindi è stata da noi utilizzata per verificare lo possibile dipendenza degli efflussi di  $Cl^-$  dall'attivazione dei recettori per opsonine.

In questo caso abbiamo utilizzato per le prove funzionali candide opsonizzate con siero scomplementato o con IgG purificate per vedere se l'attivazione di recettori diversi dava esiti diversi per quanto riguarda gli efflussi. Ricordiamo brevemente che, come già descritto nel paragrafo 5.3 di questo capitolo, l'impegno sia dei recettori per l'Fc $\gamma$  che dei recettori per il C3b determina un efflusso netto di ioni cloruro.

Nella Figura 5.21 possiamo vedere come in presenza di genisteina, in entrambe le condizioni di opsonizzazione, vi sia una netta inibizione degli efflussi di  $Cl^-$ .



**Figura 5.21** Effetto dell'inibizione di tirosin-chinasi sugli efflussi di  $Cl^-$ . Per questo esperimento le particelle fungine sono state opsonizzate con siero deprivato di anticorpi o con IgG umane purificate secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.2. I PMN sono stati sottoposti ad una preincubazione con genisteina 50  $\mu$ M (gen) prima di essere sottoposti a stimolazione.

Questi risultati dimostrano per la prima volta che gli efflussi di ioni cloruro innescati da Fc $\gamma$ -R(s) e CR3 sono dipendenti dall'attivazione di tirosin-chinasici (Figura 5.22).

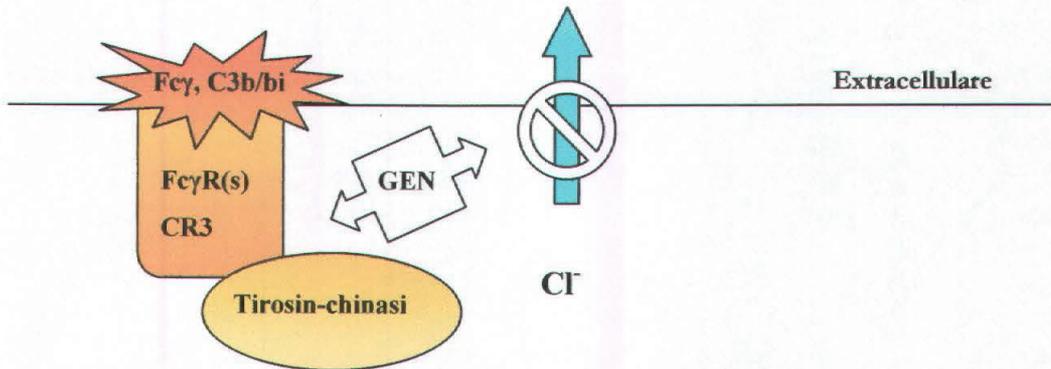
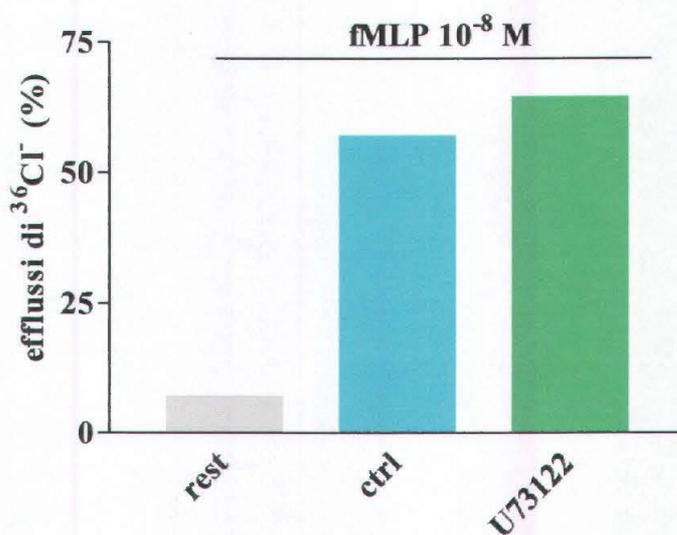


Figura 5.22 Effetto della genisteina sugli efflussi di Cl<sup>-</sup>.

### 5.12.3 Effetto dell'inibizione delle PLC attivate da G protein sugli efflussi di Cl<sup>-</sup>

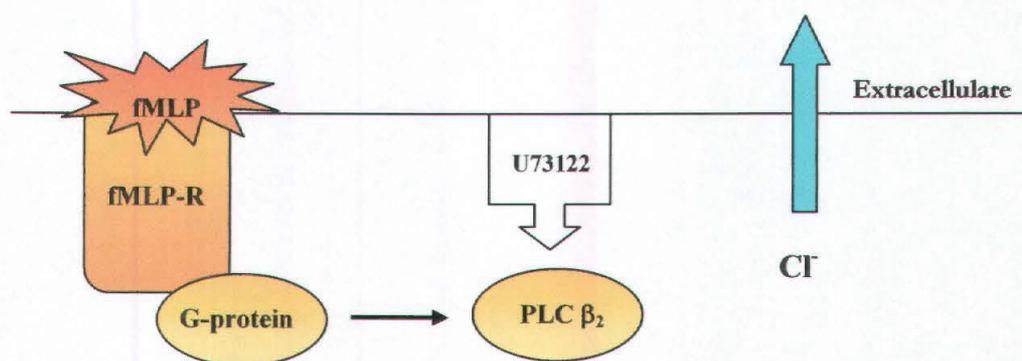
Dopo aver dimostrato che l'attivazione sia dei recettori accoppiati a proteina G sia dei recettori collegati a tirosin-chinasi è un prerequisito fondamentale per l'attivazione degli efflussi di ioni cloruro nei nostri modelli sperimentali, siamo andati ad analizzare altre fasi della cascata di segnalazione, a valle dei recettori, per cercare di capire a quale livello il Cl<sup>-</sup> potesse intervenire nel modulare il rilascio di Ca<sup>2+</sup>.

Nel corso della nostra sperimentazione siamo andati quindi a verificare se inibendo l'attività della PLC $\beta_2$ , mediante un generico inibitore delle PLC attivate da proteine G (U73122), si evidenziavano modificazioni degli efflussi di ioni cloruro. Da i dati riportati nella Figura 5.23 possiamo osservare come in PMN stimolati con fMLP non vi sia inibizione degli efflussi da parte del U73122. L'efficacia dell'U73122 è stata controllata misurando la sua capacità di inibire il rilascio di calcio dagli stores in PMN stimolati con fMLP (dato non mostrato).



**Figura 5.23** Effetto dell'inibizione delle PLC attivate da G protein sugli efflussi di Cl<sup>-</sup>. I PMN sono stati caricati con <sup>36</sup>Cl<sup>-</sup> secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.9.1 e in cubati con la U73122 prima di essere sottoposti alle prove funzionali. I dati qui rappresentati sono i risultati di un esperimento rappresentativo nel quale i PMN sono stati stimolati con fMLP:

Dai risultati ottenuti in questi esperimenti possiamo quindi affermare che la PLC $\beta_2$  non è coinvolta nella regolazione degli efflussi di Cl<sup>-</sup>.



**Figura 5.24** Effetto dell'U73122 sugli efflussi di Cl<sup>-</sup>.

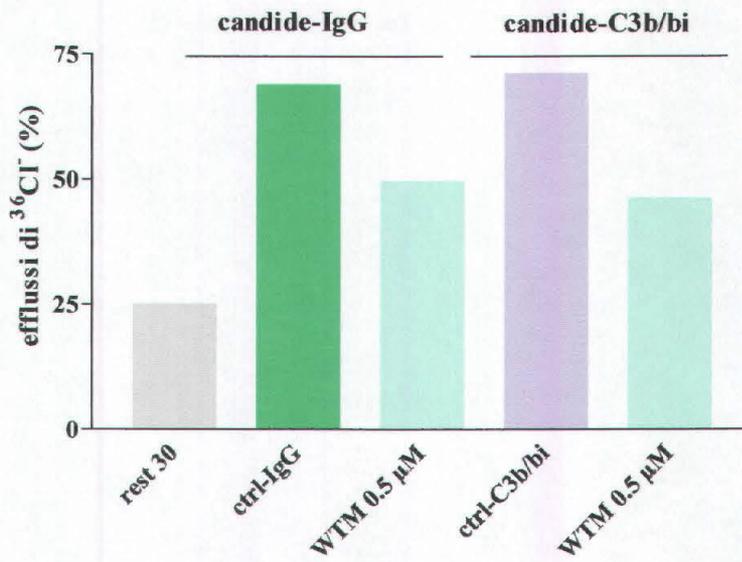
#### 5.12.4 Effetto dell'inibizione della IP3-chinasi sugli efflussi di Cl<sup>-</sup>

L'attivazione dell'IP3-chinasi, e la conseguente formazione dei fosfatidilinositoli, è un importante via di segnalazione nei leucociti. L'IP3-chinasi può essere attivata direttamente dal recettore (recettori accoppiati a proteine G) oppure può essere attivata indirettamente dal recettore tramite il coinvolgimento di alcuni componenti della famiglia RAS coinvolti nella via di segnale innescata dall'attivazione del recettore stesso (recettori tirosin-chinasici o accoppiati a tirosin-chinasi citoplasmatiche). L'attivazione dell'IP3-chinasi porta alla formazione di fosfatidilinositolo (3, 4, 5) trifosfato il quale è in grado di mediare diverse risposte funzionali, tra cui si annoverano quelle conseguenti all'attivazione di PKC e proteine Rho (Collins T., 1999).

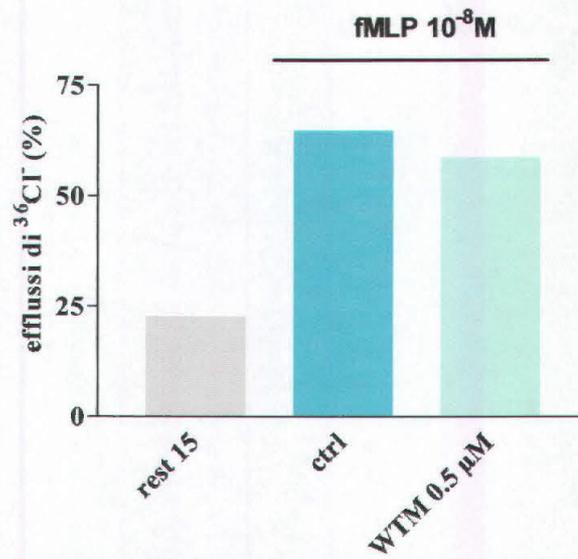
Noto che l'attivazione dell'IP3-chinasi è coinvolta nella regolazione del rilascio di Ca<sup>2+</sup> dagli stores intracellulari e che rappresenta un punto comune delle vie di segnale da noi studiate, abbiamo deciso di condurre una serie di esperimenti per verificare se l'attivazione di questo enzima fosse coinvolta nella regolazione degli efflussi di Cl<sup>-</sup>. Per fare ciò siamo andati ad analizzare gli efflussi di Cl<sup>-</sup> utilizzando come stimoli fMLP e candide, opsonizzate con siero privo di anticorpi o con siero scomplementato, in presenza di wortmannina, un noto inibitore del IP3-chinasi.

Nel pannello a della Figura 5.25 possiamo osservare che stimolando i PMN con *C. albicans* si riscontra un'inibizione degli efflussi di Cl<sup>-</sup> in presenza di wortmannina. L'osservazione degli stessi campioni in microscopia ottica a contrasto di fase metteva in evidenza anche una parziale inibizione della fagocitosi. Poiché i dati ottenuti in questo esperimento potrebbero quindi non essere attendibili, esperimenti successivi saranno dedicati a verificare se la wortmannina ha effetto anche sul riconoscimento delle particelle fagocitabili, evento determinante per l'attivazione dell'efflusso (vedi paragrafo 5.3 di questo capitolo).

a.



b.



**Figura 5.25** Effetto dell'inibizione della IP3-chinasi sugli efflussi di  $\text{Cl}^-$ . I PMN sono stati caricati con  $^{36}\text{Cl}^-$  secondo il protocollo descritto nel paragrafo 3.9.1 e in cubati con la wortmannina 0.5  $\mu\text{M}$  (WTM) prima di essere sottoposti alle prove funzionali. I dati qui rappresentati sono i risultati di un esperimento rappresentativo nel quale i PMN sono stati stimolati con candida, opsonizzate con siero deprivato di anticorpi o con IgG umane purificate, e con fMLP:

Nel pannello b della Figura 5.25 vediamo invece che i movimenti di ioni cloruro in PMN stimolati con fMLP non sono modificati dalla wortmannina; ciò fa supporre che l'IP3-chinasi non sia coinvolta nell'attivazione degli efflussi di  $\text{Cl}^-$  in questo modello sperimentale.

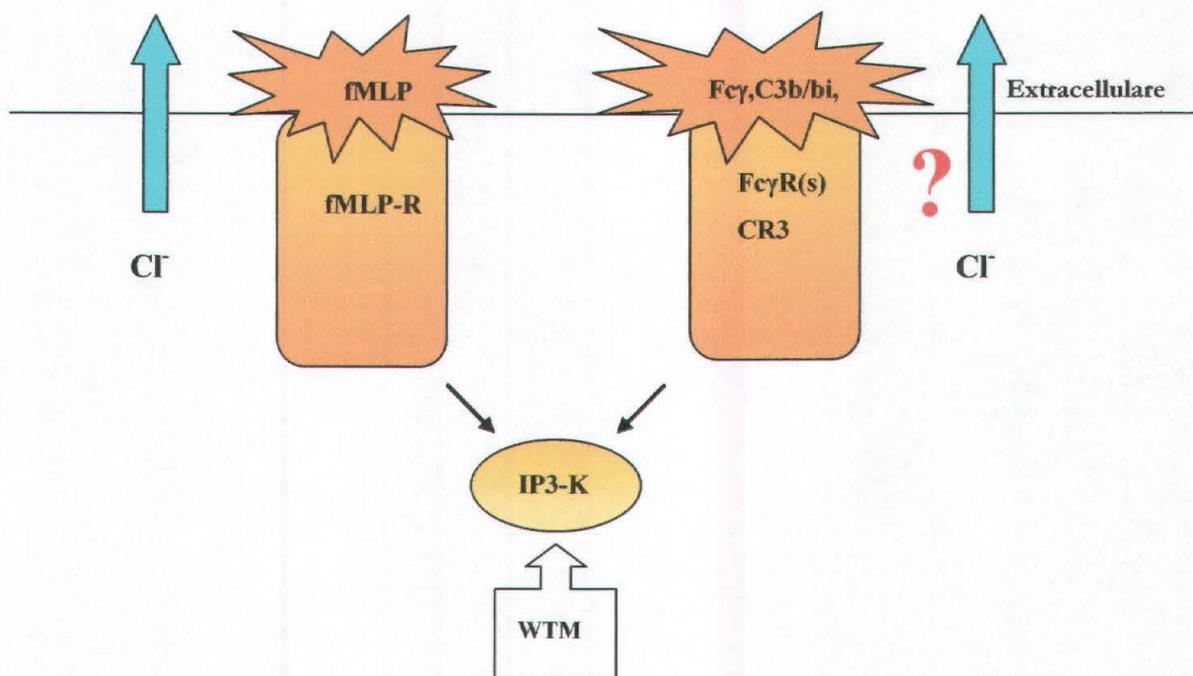


Figura 5.26 Effetto della wortmannina sugli efflussi di  $\text{Cl}^-$ .

## 6. Discussione e Conclusioni

Numerosi dati di letteratura, compresi alcuni lavori del nostro gruppo di ricerca, sono concordi nell'attribuire alle variazioni del cloruro intracellulare un importante ruolo nella modulazione di alcune funzioni dei PMN (Meyers J.B. et al., 1990; Shimizu Y. et al., 1993; Phipps D.J. et al., 1996; Menegazzi R. et al., 1999; Wheller M. et al., 2000; Menegazzi R. et al., 2000;). Il messaggio forse più innovativo che emerge da questa serie di dati propone che, nei PMN, i livelli di attivazione siano dipendenti dal contenuto di ioni cloruro. In altri termini, lo stato "resting" è caratterizzato da un'elevata concentrazione di Cl<sup>-</sup> (80-100 mM), garantita da vari meccanismi di trasporto dell'anione, compresa una Cl<sup>-</sup>-ATPasi che pompa ioni cloruro dall'ambiente extracellulare a quello intracellulare (Simchowicz L. and De Weer P., 1986). Quando i PMN vengono stimolati da vari agonisti, si osserva un rapido e intenso efflusso di cloruro che, a sua volta, provoca una marcata riduzione della concentrazione intracellulare di questo anione (Shimizu Y. et al., 1993; Meyers J.B. et al., 1990; Menegazzi R. et al., 1999; Menegazzi R. et al., 2000). Se questo efflusso netto di Cl<sup>-</sup> viene ostacolato trattando i PMN con inibitori che mantengono elevato il cloruro intracellulare, quello che ne consegue è una evidente riduzione della risposta cellulare (Menegazzi R. et al., 1999; Menegazzi R. et al., 2000). E, ancora, se i PMN a riposo vengono risospesi in tamponi modificati privi di Cl<sup>-</sup>, in modo da favorire l'efflusso dell'anione per gradiente di concentrazione, si verifica l'attivazione di alcune funzioni cellulari, quali l'adesione a superfici biologiche, l'aumento dell'espressione e l'attivazione di molecole proadesive (Menegazzi R. et al., 2000).

I risultati presentati in questa tesi hanno permesso di dimostrare che:

- particelle fagocitabili di vario tipo, quali *C. albicans*, *S. aureus* e zymosan, sono in grado di indurre, solo se opsonizzate, un intenso efflusso di Cl<sup>-</sup> paragonabile a quello innescato da noti stimoli solubili (per es., fMLP e TNF);
- questo efflusso provoca una rapida, sostenuta e irreversibile riduzione dei livelli intracellulari di cloruro;
- l'efflusso di Cl<sup>-</sup> non dipende dalla riorganizzazione del citoscheletro, che media l'internalizzazione delle particelle, ma piuttosto dal legame delle particelle opsonizzate ai recettori cellulari Fcγ-R(s) e CR3 che riconoscono le opsonine IgG e C3b/bi;

- l'inibizione dei flussi di cloruro è accompagnata da una proporzionale inibizione dell'attività microbica nei confronti di *C. albicans*;
- l'inibizione dell'attività candidacida sembra essere riconducibile all'inibizione del rilascio di MPO dai granuli azurofilici; infatti, questo compartimento granulare risulta essere particolarmente sensibile ai livelli intracellulari di cloruro;
- nelle condizioni sperimentali adottate, l'uso di inibitori del trasporto di Cl<sup>-</sup> appartenenti a famiglie strutturalmente non correlate, non modifica sostanzialmente né il rilascio di granuli specifici né l'attivazione del burst respiratorio e la conseguente produzione di specie microbicide derivate dall'ossigeno;
- l'inibizione dei flussi di cloruro, e la conseguente preferenziale riduzione del rilascio di granuli azurofilici, si accompagna, nelle nostre condizioni sperimentali, ad una proporzionale inibizione dell'aumento dei livelli di Ca<sup>2+</sup> citoplasmatico;
- risultati analoghi, che suggeriscono l'esistenza di una correlazione tra modificazione del Cl<sup>-</sup> intracellulare, innalzamento dei livelli citoplasmatici di Ca<sup>2+</sup> e degranolazione, sono stati ottenuti stimolando i PMN con fMLP;
- nel modello dei PMN fagocitanti, l'analisi delle vie di segnalazione intracellulare innescate dall'impegno dei recettori per le opsonine ha consentito di individuare la *dipendenza* degli efflussi di cloruro dall'attivazione di tirosin chinasi e la loro *indipendenza* dall'aumento del calcio citoplasmatico;
- anche nel caso della stimolazione con fMLP, l'attivazione dei flussi di Cl<sup>-</sup> sembra rappresentare un evento molto precoce, in quanto *sensibile* alla tossina della pertosse ma *indipendente* dall'attivazione della PLC, della IP3-chinasi e dall'innalzamento dei livelli del Ca<sup>2+</sup> citoplasmatico.

Nel loro insieme, i risultati ottenuti sono coerenti con le recenti acquisizioni sulla fisiologia dei PMN che assegnano al Cl<sup>-</sup> il ruolo di “nuovo” secondo messaggero. Inoltre, va sottolineato il fatto che alcuni dei risultati presentati in questa tesi non trovano precedenti in letteratura. Tra questi vanno ricordati (a) la dimostrazione che l'interazione con stimoli particolati è in grado di innescare movimenti di Cl<sup>-</sup> nei PMN, (b) la dimostrazione che il/i recettore/i per la porzione Fc delle IgG è capace di segnalare per l'attivazione di flussi di Cl<sup>-</sup> e (c) l'evidenza che un rapido efflusso di Cl<sup>-</sup> sia coinvolto nella regolazione dell'innalzamento dei livelli del Ca<sup>2+</sup> citoplasmatico.

## 7. Bibliografia

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D.: *Biologia Molecolare della Cellula*. Zanichelli ed. (1991), II ediz.

Anderson C.L., Shen L., Eicher D.M., Wewers M.D., Gill J.K.: Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. *J. Exp. Med.* (1990), 171: 1333.

Baron A., Pacaud P., Loirand G., Mirronneau C.: Pharmacological block of Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pfluegers. Arch. Eur. J. Physiol.* (1991), 419: 553-558.

Bergmeyer H.U: *Methods of Enzymatic Analysis*. Edited by Bergmeyer H.U., Academic Press, (Germany, Canada, USA 1981), III ediz.

Bretag A.H., Dawe S. R., Kerr D.I. and Moskwa A. G.: Myotonia as a side effect of diuretic action. *Br. J. Pharmacol.* (1980), 71: 467-471.

Brillhart K.L., Ngo T.T.: Use of microwell plates carrying hydrazide groups to enhance antibody immobilization in enzyme immunoassays. *J. Immunol. Methods* (1991), 144: 19-25.

Belén Martin-Martin, S. V.M. Nabokina, J. Blasi, P. A. Lazo and F. Mollinedo: Involvement of SNAP-23 and syntaxin 6 in human neutrophil exocytosis, *Blood* (2000), 96: 2574-2583.

Bernard M. Babior: NADPH Oxidase: An Update. *Blood* (1999), 93: 1464.

Berton G. "Degranulation" 703-719. In: Gallin J.I. and Snyderman: "Inflammation: Basic principle and clinical correlates". Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (1999), VI ediz.

Bjerknes R.: Flow cytometric assay for combined measurement of phagocytosis and intracellular killing of *C. albicans*. *J. Immunol. Methods* (1984) 72: 229.

Bokoch Gary M. Chemoattractant signalling and leucocyte activation. *J. of American Society of Hematology, Blood* (1995),86 (5): 1649-1660.

Bosanac I., Michikawa T., Mikoshiba K., Ikura M.: Structural insights into the regulatory mechanism of IP3 receptor. *Biochim Biophys Acta*, (2004) 1742:89-102.

Busetto S., Trevisan E., Patriarca P., Menegazzi R., "A single-step, sensitive flow cytometric assay for the simultaneous assessment of membrane-bound and ingested *C. albicans* in phagocytosing neutrophils", *Cytometry* 2004 Apr. 58 A: 201-6.

Cech P. and R.I. Lehrer: Phagolysosomal pH of human neutrophils. *Blood* (1984), 63: 88.

Chuang F. Y. S., Sassaroli M., Unkless J. C. convergence of Fcγ Receptor IIA and Fcγ Receptor IIIB Signaling Pathways in Human Neutrophils. *The J. of Immunol.* (2000)164: 350-360.

Collins F.S.: Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* (1992), 256: 774.

Collins T. "Acute and Chronic Inflammation"50-88. In: Cotran R.S., Kumar V., Collins T.: Robbins: "Pathologic basis of Diseases". W.B. Saunders Company, Philadelphia (1999), VI ediz.V.

Collins T. "Acute and Chronic Inflammation"50-88. In: Cotran R.S., Kumar V., Collins T.: Robbins: "Degranulation". W.B. Saunders Company, Philadelphia (1999), VI ediz.V.

DeLeo Frank R. and M. T.Quinn: Assembly of the phagocyte NADPH oxidase: molecular interaction of oxidase proteins. *J. Leukocyte Biol.* (1996), 60:677.

De Loof A., The electrical dimension of cells: the cell as a miniature electrophoresis chamber . *Int Rev Cytol.* (1986);104:251-352.

Di Virgilio F., Meyer B.C., Greenberger S. and Silverstein S.C.: Fc receptor-mediated phagocytosis occurs in macrophages at exceedingly low cytosolic  $Ca^{2+}$  levels. *J. Cell Biol.* (1988), 106: 657-666.

Dri P., Cramer R., Spessotto P., Romano M. and P. Patriarca: Eosinophil activation on biologic surfaces. Production of  $O_2^-$  in response to physiologic soluble stimuli is differentially modulated by extracellular matrix components and endothelial cells. *J. Immunol.* (1991), 147: 613.

Emmendorffer A., Hecht M., Lohmann-Matthes M. and Roesler J.: A fast and easy methods to determine the productions of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J. Immunol. Methods* (1990), 131: 269.

Ellis J.A., Mayer S.J. and Jones O.T.G.: The effect of the NADPH-oxidase inhibitor diphenyleneiodonium on aerobic and anaerobic microbicidal activities of human neutrophils. *Biochem. Journ.* (1988), 215: 887- 891.

Elsbach P., Weiss J. and Levy O. "Oxygen-independent antimicrobial systems of phagocytes" 801-817. In: Gallin J.I. and Snyderman: "Inflammation: Basic principle and clinical correlates". Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (1999), VI ediz.

Fittschen C., Henson P.M.: Linkage of azurophil granule secretion in neutrophils to chloride ion transport and endosomal transcytosis. *J Clin Invest.* (1994), 93: 247-55.

Frauschou M., Borregard N.: Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes. Infect.* (2003), 5, issue 14:1317-1327.

Fryer D. R., M. L. Morganroth, C. E. Rogers, M. A. Arnaout and R. F. Todd III. Modulation of surface CD11/CD18 glycoproteins (Mo1, LFA-1, p150/95) by human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Immunol. Immunopathol.* (1988); 46 (2): 272.

Greenberg S. "Biology of phagocytosis" 681-701. In: Gallin J.I. and Snyderman: "Inflammation: Basic principle and clinical correlates". Lippincott Williams & Wilkins,

Philadelphia (1999), VI ediz.

Henson P. M., Henson J.E., Fittschen C., Kiman G., Bratton D. L. and Riches D. W. H. "Degranulation and secretion by phagocytic cells" 511-539. In Gallin J. I., Goldstein I. M., Snyderman: "Inflammation: Basic principles and clinical correlates", Raven Press (1992) II ediz.

Hogg N., J. Harvey, C. Cabanas and R. C. Landis. Control of Leukocyte Integrin Activation. *Am. Rev. Respir. Dis.* (1993); 148: s55.

Ince C., Coremans J., Ypey D., Leijh P., Verveen A., Van Furth R. Phagocytosis by human macrophages is accompanied by changes in ionic channel currents. *J. Cell Biol.* (1988), 106:1873-1878.

Jaconi M. E. E. , Theler J. M., Schlegel W., Appel R. D., Wright S. D. and Lew P. D. multiple elevations of cytosolic-free  $Ca^{2+}$  in human neutrophils: initiation by adherence receptors of the integrin family. *J. Cell Biol.* (1991), 112: 1249-1257.

Jaconi M. E. E., Lew D.P., Carpentier J.-L., Magnusso K.-E., Sjögren M. and Stendahl O.: Cytosolic free calcium elevation mediates the phagolysosome-lysosome fusion during phagocytosis in human neutrophils. *J. Cell Biol.* (1990), 100: 1555-1564.

Jeffrey C., Edberg, Moon J. J., Chang D. J., Kimberly R. P. Differential regulation of human neutrophil Fcγ Receptor IIA (CD32) and Fcγ Receptor IIIB (CD16)-induced  $Ca^{2+}$  transients. *The J. of Biological Chemistry* (1998), 273, n. 14: 8071-8079.

Klebanoff S.J. "Oxygen metabolites from phagocytes" 721-760. In: Gallin J.I. and Snyderman: "Inflammation: Basic principle and clinical correlates". Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (1999), VI ediz.

Korchak H. M., Eisenstat B. A., Hoffstein S. T., Dunham P. B., Weissmann G. anion channel blockers inhibits lysosomal enzyme secretion from human neutrophils without affecting generation of superoxide anion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1980), 77: 2721.

Krause K. H., M.J. Welsh: Voltage-dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated ion channels in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* (1990), 85: 491.

Kumar, Abbas, Fausto: Robbins e Cotran "Le basi patologiche delle malattie". Elsevier Italia (2005) VII ediz.

Lee W.L., R.E. Harrison, S. Grinstein: Phagocytosis by neutrophils. *Microbes and Infection* (2003) 5:1299-1306.

Leto T.L. "The Respiratory Bursts Oxidase" 769-786. In Gallin J.I. and Snyderman: "Inflammation: Basic principle and clinical correlates". Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (1999), VI ediz.

Lew D. P., Andersson T., Hed J., Di Virgilio F., Pozzan T. and Sthendal O.:  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent phagocytosis in human neutrophils, *Nature* (1985), 315: 509-511.

Lew D.P., Monod A., Waldvogel F. A., Dewald B., Baggiolini M. and Pozzan T.: Quantitative analysis of the cytosolic free calcium dependency of exocytosis from three subcellular compartments in intact human neutrophils. *J. Cell Biol.* (1986), 102: 2179.

Lew D.P., Wollheim C.B., Waldvogel F.A., and Pozzan T.: Modulation of cytosolic-free calcium transients by changes of intracellular calcium buffering capacity: Correlation with exocytosis and  $\text{O}_2$  production in human neutrophils. *J. Cell Biol.* (1984), 99: 1212-1220.

Lofgren R., Serrander L., Forsbeg M., Wilsson A., Wasteson A. Stendhal O. CR3, Fc $\gamma$  Receptor IIA and Fc $\gamma$  Receptor IIIB induce activation of the respiratory burst in human neutrophils: the role of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , phospholipase D and tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* (1999), Oct 13:1452 (1): 46-59.

Logan M. R., Odemuyiwa S. O., Moqbel R.: Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: The molecular basis of mediator secretion, *J. Allergy Clin.*

Immunol (2003).

Maertens C, Wei L, Voets T, Droogmans G, Nilius: Block by fluoxetine of volume-regulated anion channels. *Br J Pharmacol.* 1999 Jan;126(2):508-14.

Menegazzi R., Busetto S., Decleva E., Cramer R., Dri P. and Patriarca P.: Trigger of chloride ion efflux from human neutrophils as a novel function of leukocyte  $\beta_2$  integrins. Relationship with spreading and activation of the respiratory burst. *J. Immunol.* (1999), 162: 423.

Menegazzi R., Busetto S., Dri P., Cramer R. and P. Patriarca: Role of intracellular chloride in the reversible activation of neutrophil  $\beta_2$  integrins: A lesson from TNF stimulation. *J. Immunol.* (2000), 165: 4606.

Menegazzi R., Zabucchi G., Knowles A., Cramer R. and P. Patriarca: A new, one-step assay on whole cell suspensions for peroxidase secretion by human neutrophils and eosinophils. *J. Leukocyte Biol.* (1992), 52:619.

Metcalf J.A., Gallin J.I., Nauseef W.M. and R.K. Root: Preparation of cells and materials for functional assays. In: "Laboratory manual of neutrophil function". (1986) Raven Press, New York, pp. 5-6

Meyers J.B., H.F. Cantiello, J.H. Schwartz, A.I. Tauber: Phorbol ester-stimulated human neutrophil membrane depolarisation is dependent on  $Ca^{2+}$ -regulated  $Cl^-$  efflux. *Am. J. Physiol.* (1990), 259: C531.

Morrison A.J. and C. C. Malbon. Physiological regulation of G Protein-Linked signalling. *Physiological Reviews* (1999), 79 (4):1373-1413.

Nagaoka I., Hirota S., Yomogida S., Ohwada A., Hirata M.: Synergistic actions of antibacterial neutrophil defensins and cathelicidins. *Inflammation Res.* (2000), 49: 73.

Nath J., Powledge A., Wright DG.: Involvement of a botulinum toxin-sensitive 22-kDa G protein in stimulated exocytosis of human neutrophils. *J Immunol.* (1994), 152: 1370-1379.

Ng-Sikorski, Andersson R., Patarroyo M., Andersson T. Calcium signalling capacity of the C11b/CD18 integrin on human neutrophils. *Exp. Cell Res.* (1991), 195: 504-520.

Parij N, Nagy AM, Fondu P, Neve J.: Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils. *Eur J Pharmacol.* (1998) Jul 10;352(2-3):299-305.

Pacaud P., G. Loirand, A. Baron, C. Mironneau, J. Mironneau: Ca<sup>2+</sup> channel activation and membrane depolarization mediated by Cl<sup>-</sup> channels in response to noradrenaline in vascular myocytes. *Br. J. Pharmacol.* (1991), 104: 1000.

Phipps D. J., Branch D. R., Schlichter L. C. chloride-Channel block Inhibits T lymphocyte activation and signalling. *Cell Signaling* (1996), 8 (2): 141-149.

Poste G. and Allison A.C. Membrane fusion. *Biochim Biophys Acta.* 1973 Dec 28;300(4):421-65

Prossnitz E. R. Schreiber R.E., Bokoch G. Ye R.D. binding of low affinity N-formyl peptide receptors to G protein. Characterization of a novel inactive receptor intermediate. *J. Of Bioch. Chem.* (1995), 270 (5): 10686-10694.

Roch-Arveller M., Maman L., Huy D.P., Fontagne J., Giroud J.P. Sorenson J. R. Modulation of polymorphonuclear leukocyte responsiveness by copper (II)2 (niflumate)4. *Imflamm Res.* (1995), 44 (5): 198-203.

Ross G. D., W. Reed, J. G. Danzell, S. E. Becker and N. Hogg. Macrophage Cytoskeleton Association with CR3 and CR4 Regulates Receptor Mobility and Phagocytosis of iC<sub>3</sub>b Opsonized Erythrocytes. *J. Leuk. Biol.* (1992); 51: 109.

Sahlin S., Hed J. and Rundquist I.: Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorimetric assay. *J. Immunol Methods* (1983), 60: 115.

Scapini P., Lapinet-Vera J. A., Gasperini S., Calzetti F., Buzzoni F. and Casatella M. A.: The neutrophils as a cellular source of chemokines. *Immunological Reviews* (2000), 177: 195-201.

Scott-Ward Section T.S., Li Section Sign H., Schmidt A., Cai Z., Sheppard D. N. Direct block of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by niflumic acid. *Mol membr. Biol.*( 2004), 21 (1): 27-38.

Schumann M. A., P. Garden, T.A. Raffin: Recombinant human tumor necrosis factor  $\alpha$  induces calcium oscillation and calcium-activated chloride current in human neutrophils. The role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *J.Biol. Chem* (1993), 268: 2134.

Schumman M.A., A.T. Raffin: Activation of a voltage-dependent chloride current in human neutrophils by phorbol 12-myristate 13-acetate and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. The role of protein kinase. *J. Biol. Chem.* (1994), 269: 2389.

Segal A.W., Geisow M., Garcia R., Harper A, Miller R.: The respiratory burst of phagocytic cells is associated with a rise in vacuolar pH. *Nature* (1981), 290:406.

Sengelov H., Kjeldsen L. and Borregard N.: Control of exocytosis in early neutrophil activation, *J. Immunol* (1993), 150: 1535- 1543.

Shimizu Y., R.H. Daniels, M.A. Elmore, M.J. Finnen, M.E. Hill, J.M. Lackie: Agonist-stimulated Cl<sup>-</sup> efflux from human neutrophils. A common phenomenon during neutrophil activation. *Biochem. Pharmacol.* (1993), 45: 1743.

Simchowicz L., J.A. Bibb: Functional analysis of the modes of anion transport in neutrophils and HL-60 cells. *Annu. Rev. Physiol.* (1990), 52: 381.

Simchowitz L., J.A. Textor, E. Cragoe Jr.. Cell volume regulation in human neutrophils: 2-(aminomethyl) phenols as Cl<sup>-</sup> channel inhibitors. *Am. J. Physiol.* (1993), 265: C143.

Simchowitz L., P. De Weer: Chloride movements in human neutrophils. Diffusion, exchange, and active transport. *J. Gen. Physiol.* (1986), 88: 167.

Smith R, J., Bowman B. J., Inde S. S. effects of an ion channel blocker, 4, 4'-diisothiocyano-2,2'-disulfonic acid stilbene (DIDS), on human neutrophil function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1984), 120: 964.

Skubitz KM, Vercellotti GM, Greenberg CS, Eaton JW: Impermeant stilbene disulfonic acids block chemotactic peptide receptor function on human granulocytes. *Inflammation.* (1989) Feb;13(1):31-45.

Someya A., Nuno H., Hasebe T. and I. Nagaoka: Phosphorylation of p40 during activation of neutrophil NADPH oxidase. *J. Leukocyte Biol.* (1999), 66: 851.

Stewart M. P., A. McDowall and N. Hogg. LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca<sup>2+</sup>-dependent protease, calpain. *J. Cell Biol.* (1998); 140 (3): 699.

Theler J.-M., Lew D.P., Jaconi M.E., Krause K.-H., Wollheim C.B. and Schlegel W.: Intracellular patten of cytosolic Ca<sup>2+</sup> changes during adhesion and multiple phagocytosis in human neutrophil. Dynamics of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *Blood* (1995), 85: 2194-2201.

Vedder N. B. and Harlan J. M. Increased surface expression of Cd11b/CD18 (Mac-1) in not required for stimulated neutrophil adherence to cultured endothelium. *J. Clin. Invest.* (1988), 81: 676.

Vowells S.J., Sekhsaria S., Malech H.L., Shalit M. and Fleisher T.A.: Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J. Immunol. Methods* (1995), 178: 89.

Walgoz B., Seifter R., Zakrzewicz a., Gaehtgens P., Ley K. Cross-linking of CD18 in neutrophils induces an increase of intracellular free  $Ca^{2+}$ , exocytosis of azurophilic granules, quantitative up-regulation of CD18, shedding of L-selectin, and actin polymerization. *J. Leukoc. Biol.* (1994) 56: 625-635.

Wheater, Burkitt; Daniels: *Istologia e anatomia microscopica*. Ambrosiana ed.(1988), II ediz.

Wheller M., Stachlewitz R.F., Yamashina S., Ikejima K., Morrow AL., Thurman R.G.: Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *Faseb J.* (2000), 14: 476.

Wilsson A., Lundqvist H., Gustafsson M., Stendahl O.: Killing of phagocytosed *Staphylococcus aureus* by human neutrophils requires intracellular free calcium. *J. of Leuk. Biology* (1996) 59: 902-907.

Witko-Sarsat V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, L. Halbwachs-Mecarelli: Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Biology of Diseases* (2000) 80: 617-640.

Wright D. G. and Gallin J.: Secretory response of human neutrophils: exocytosis of specific (secondary) granules by human neutrophils during adherences in vitro and during exudation in vivo, *J. Immunol.*, (1979), 123: 285-294.