

455749

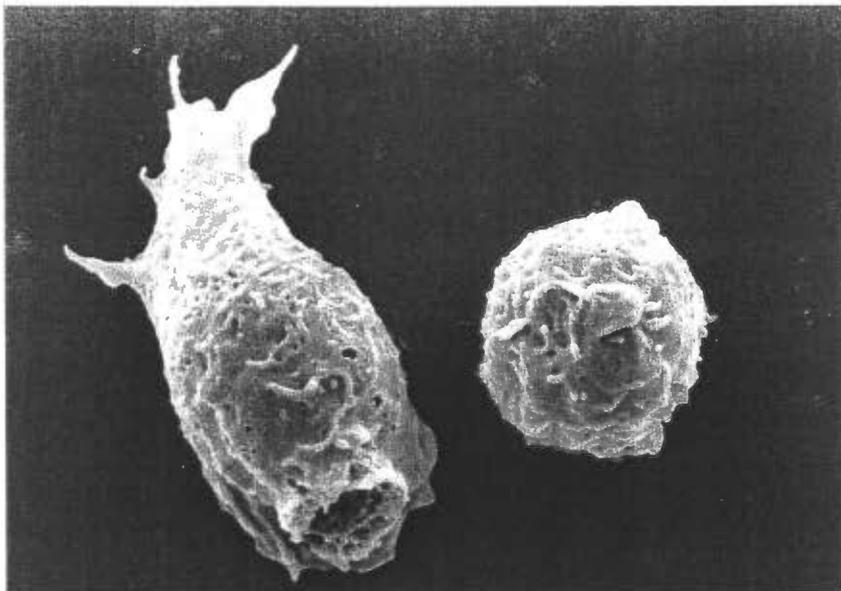
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE
SEDE CONSORZIATA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

DOTTORATO DI RICERCA IN PATOLOGIA SPERIMENTALE
X CICLO

**RUOLO DELLE INTEGRINE LEUCOCITARIE NELL'ADESIONE E
NELL'ATTIVAZIONE METABOLICA DEI LEUCOCITI
POLIMORFONUCLEATI NEUTROFILI UMANI STIMOLATI CON
IL FATTORE DI NECROSI TUMORALE**

DIPARTIMENTO DI FISILOGIA E PATOLOGIA
UNIVERSITÀ DI TRIESTE



dott. Eva Decleva 168

en

Coordinatore:
prof. Pierluigi Patriarca
Dipartimento di Fisiologia e Patologia
Università di Trieste

Tutore:
prof. Pierluigi Patriarca

Co-tutore:
dott. Rita Cramer
Dipartimento di Fisiologia e Patologia
Università di Trieste

DR 071/9

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE
SEDE CONSORZIATA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

DOTTORATO DI RICERCA IN PATOLOGIA SPERIMENTALE
X CICLO

**RUOLO DELLE INTEGRINE LEUCOCITARIE NELL'ADESIONE E
NELL'ATTIVAZIONE METABOLICA DEI LEUCOCITI
POLIMORFONUCLEATI NEUTROFILI UMANI STIMOLATI CON
IL FATTORE DI NECROSI TUMORALE**

dott. Eva Decleva

DIPARTIMENTO DI FISIOLOGIA E PATOLOGIA
UNIVERSITÀ DI TRIESTE

Coordinatore:


prof. Pierluigi Patriarca
Dipartimento di Fisiologia e Patologia
Università di Trieste

Tutore:


prof. Pierluigi Patriarca

Co-tutore:


dott. Rita Cramer
Dipartimento di Fisiologia e Patologia
Università di Trieste

ANNO ACCADEMICO 1997/98

INDICE

INTRODUZIONE	1
Centralità dell'adesione nella fisiologia e patologia degli organismi multicellulari: ruolo delle integrine	1
Integrine e funzionalità leucocitaria	2
Integrine β_2 : distribuzione ed espressione	4
Struttura delle integrine β_2 : omologie e differenze	6
Attivazione integrinica e riconoscimento del ligando: ruolo dei cationi divalenti	8
Meccanismi d'azione di anticorpi monoclonali che alterano la funzionalità integrinica	9
Cambiamenti di affinità e avidità come effetto dell'attivazione delle integrine β_2	10
Integrine β_2 e cooperazioni interrecettoriali	11
Ruolo delle integrine β_2 nelle funzioni dei PMN dipendenti dall'adesione	14
SCOPO DELLA TESI	17
MATERIALI E METODI	18
Isolamento dei leucociti polimorfonucleati neutrofili (PMN) da sangue umano periferico	18
Rivestimento dei pozzetti	19
Valutazione del legame degli anticorpi alle superfici	22
Saggi funzionali	23
<i>Valutazione del metabolismo ossidativo</i>	23
Misura della produzione di anione superossido	23
Misura dello <i>shunt</i> dei pentosi	24
<i>Misura dell'adesione</i>	26
Valutazione del grado di polimerizzazione del citoscheletro	27
Allestimento dei preparati per l'osservazione al microscopio elettronico a scansione	28
Valutazione dell'espressione delle integrine	29
Produzione e purificazione di anticorpi monoclonali	30
Preparazione di frammenti F(ab') ₂ da anticorpi monoclonali interi	32
RISULTATI E DISCUSSIONE	34
Attivazione metabolica dei PMN indotta dal TNF: dipendenza dall'adesione	34
Caratterizzazione dell'adesione dei PMN a LM ed a FN	35

<i>Valutazione della forza di ancoraggio delle cellule al substrato</i>	35
<i>Morfologia dei PMN stimolati con TNF su LM e su FN</i>	36
Inibizione dello <i>spreading</i> su FN ed induzione dello <i>spreading</i> su LM: effetti sul metabolismo ossidativo	37
<i>Inibizione dello spreading su FN</i>	37
<i>Induzione dello spreading su LM</i>	37
Polimerizzazione dell'actina citoscheletrica in PMN a riposo e stimolati con TNF: influenza delle condizioni di adesione	39
Caratterizzazione molecolare dell'adesione dei PMN a FN e a LM: dipendenza da integrine β_2	41
<i>Espressione di integrine β_1 e β_2 in PMN a riposo e stimolati con TNF</i>	41
<i>Ruolo delle integrine β_1 e β_2 nell'adesione TNF-dipendente dei PMN a FN e LM</i>	41
<i>Integrine β_2 espresse dai PMN: distribuzione di membrana in condizioni resting e dopo trattamento con TNF</i>	42
<i>Effetto di mAb anti catene α-integriniche sull'adesione a FN e a LM di PMN stimolati con TNF</i>	43
Metabolismo ossidativo di PMN stimolati con TNF su FN e LM: effetto di mAb anti α	44
Confronto tra l'effetto di mAb anti α interi e dei corrispondenti frammenti $F(ab')_2$ sul metabolismo ossidativo e sull'adesione di PMN stimolati con TNF	45
Metabolismo ossidativo e adesione a FN di PMN stimolati con TNF: effetto di $F(ab')_2$ anti α singoli ed in miscela	46
Valutazione diretta della capacità delle integrine β_2 di trasdurre un segnale per l'attivazione metabolica: messa a punto del modello sperimentale	47
Effetto del <i>crosslinking</i> di integrine β_2 da parte di mAb immobilizzati alla plastica sul metabolismo ossidativo di PMN stimolati con TNF	49
Metabolismo ossidativo di PMN stimolati con TNF su anticorpi immobilizzati al supporto in modo da escludere l'interferenza della porzione Fc	49
<i>Legame dei mAb alla proteina G</i>	49
<i>Immobilizzazione dei frammenti $F(ab')_2$</i>	50
Riconoscimento delle integrine da parte di mAb anti α : effetto dell'EDTA	51
Produzione di O_2^- in PMN stimolati con TNF su mAb anti integrine β_2 : normalizzazione per il numero di cellule catturate	52
Ruolo del TNF nella capacità di $\alpha_L\beta_2$ di generare un segnale di attivazione metabolica	52
CONCLUSIONI	57
BIBLIOGRAFIA	60

INTRODUZIONE

1. Centralità dell'adesione nella fisiologia e patologia degli organismi multicellulari: ruolo delle integrine

La vita negli organismi pluricellulari è vita di relazione in cui ogni cellula deve avere la capacità di interagire con il suo microambiente, sia esso rappresentato da altre cellule o da componenti della matrice extracellulare (MEC). Nonostante esistano complesse reti di comunicazione intercellulare «a distanza», mediate da fattori solubili, e situazioni in cui una cellula può trovarsi momentaneamente isolata dalle altre e svincolata da un substrato solido, l'organismo in quanto tale è coesione di elementi: ogni rapporto tra essi non può prescindere da un contatto fisico più o meno duraturo.

L'adesione cellula-cellula o cellula-MEC, fondamentale nella morfogenesi come nella fisiologia tissutale dello stadio adulto, ha un ruolo cruciale anche nei fenomeni patologici, dall'infiammazione alla neoplasia: le normali interazioni adesive possono infatti venir meno, altre se ne possono instaurare dove non dovrebbero o persistere nel tempo più del necessario. Ognuno di questi eventi è mediato da glicoproteine transmembranarie con funzione recettoriale, i cosiddetti «recettori di adesione», raggruppabili in quattro principali famiglie geneticamente e biochimicamente distinte ma spesso funzionalmente correlate: integrine, caderine, superfamiglia delle immunoglobuline (Ig), selettine [1].

Le **integrine** sono eterodimeri costituiti da una subunità α ed una β , ciascuna delle quali è rappresentata in più varianti e si associa con l'altra in maniera non covalente originando diverse combinazioni; la nomenclatura integrinica si basa proprio sul fatto che una stessa catena β può legarsi a differenti *partner* α , permettendo quindi di suddividere queste glicoproteine in sottofamiglie β_1 , β_2 e così via. Le integrine sono espresse ad alta densità sulla maggior parte dei tipi cellulari e rappresentano senz'altro l'insieme di molecole di adesione più ampio (oltre una ventina di componenti) e versatile: infatti, non solo sono responsabili dell'ancoraggio delle cellule alla MEC, ma possono anche intervenire nella comunicazione intercellulare riconoscendo come controrecettori i membri della superfamiglia delle Ig [2]. Grazie alla loro capacità di trasdurre segnali intracellulari esse favoriscono il «dialogo» della cellula con l'ambiente che la circonda, integrando le risposte innescate dai mediatori solubili con gli specifici messaggi provenienti dalla MEC.

In effetti, le integrine possono funzionare in maniera additiva o sinergica con i fattori di crescita e le citochine, sebbene non sia ancora chiaro se tale cooperatività implichi meccanismi di segnalazione affatto indipendenti, reciprocamente permissivi o sinergici [3].

Poiché sono in grado di modulare la riorganizzazione del citoscheletro, le integrine risultano importanti nel regolare la morfologia e motilità cellulare [4]; è quindi facilmente intuibile la centralità del loro ruolo in tutti i fenomeni caratterizzati da migrazione cellulare, come ad esempio il normale traffico linfocitario, la migrazione transendoteliale dei leucociti in risposta al danno, il processo di metastatizzazione, l'angiogenesi ecc. Contribuendo inoltre alla regolazione dell'espressione genica, queste molecole possono guidare una cellula ad entrare nel ciclo proliferativo, oppure ad uscirne per differenziarsi o morire; sono perciò fondamentali in tutte le fasi dello sviluppo, così come nella dinamica della crescita tumorale [5-8].

2. Integrine e funzionalità leucocitaria

Linfociti, monociti/macrofagi e granulociti sono cellule mobili per eccellenza, principalmente circolanti nel sistema vascolare, ma in grado di attraversare la barriera endoteliale e migrare nei tessuti al momento opportuno; l'extravasazione sarà «di routine» nel fisiologico ricircolo delle cellule T via tessuti linfatici, o costituirà l'evento culmine nella vita di un polimorfonucleato neutrofilo attratto da agenti chemiotattici verso il focolaio infiammatorio [1].

Il nutrito corredo integrinico di cui tutti i leucociti sono dotati ben si adatta alla dinamicità di tali cellule, che devono poter instaurare con il loro microambiente interazioni adesive transienti e coordinate fra loro. L'attitudine delle integrine a mediare i rapporti cellula-cellula e cellula-matrice trova così espressione nella funzionalità del sistema immunitario: la migrazione dei linfociti T verso le aree linfatiche, la presentazione dell'antigene, l'attività citotossica dei linfociti NK e quella anticorpo-mediata di monociti e granulociti sono tutti fenomeni finemente regolati dall'intervento di questi recettori adesivi [5, 8]. Ancora, le integrine sono molecole chiave nel processo multifasico dell'adesione dei leucociti infiammatori all'endotelio, nel successivo attraversamento dell'endotelio stesso e nella migrazione attraverso i tessuti, come pure nel riconoscimento e nella fagocitosi del microorganismo patogeno [1, 6].

Nelle cellule aderenti esse si concentrano in aree specializzate della membrana plasmatica ricche in proteine citoscheletriche, che costituiscono punti di «contatto focale» con la MEC [9, 10]. Questa loro localizzazione è mediata dal legame diretto delle code citoplasmatiche delle subunità β con componenti del citoscheletro quali talina, tensina, vinculina, paxillina, α -actinina, filamina [3, 11-14]; le integrine costituiscono pertanto la connessione fisica tra proteine di adesione extracellulari (in particolare la fibronectina) e citoscheletro corticale, connessione che è per sua natura dinamica e prevede il formarsi e scomparire di associazioni molecolari diverse nel tempo [3].

Le integrine sono prive di attività enzimatica intrinseca e sembra che la loro attività segnalatoria dipenda proprio dalla capacità di interagire con il citoscheletro actinico e di regolarne il riassetto; l'aggregazione di integrine indotta dai ligandi polivalenti della MEC provocherebbe infatti un ampio accumulo di proteine citoscheletriche e molecole trasduttrici che darebbe a sua volta il via ad una vera e propria cascata segnalatoria. In quest'ambito, un evento precoce di particolare importanza sembra essere la tirosin-fosforilazione di chinasi quali p125^{FAK} (di cui è documentato il legame con la porzione citoplasmatica della catena integrinica β_1 [15]) che fosforilerebbero successivamente componenti citoscheletriche quali la paxillina e molecole di segnale come PLC γ , MAP chinasi ecc. [3, 6]; le vie di trasduzione così innescate sarebbero però diverse non solo a seconda dell'integrina coinvolta, ma anche del tipo cellulare considerato e del suo stato funzionale [17]; ciò è indice dell'estrema versatilità delle integrine, che evidentemente possono instaurare tramite la loro subunità β associazioni variabili e peculiari di determinate condizioni cellulari.

Le integrine espresse dai leucociti (13 quelle finora identificate) appartengono alle sottofamiglie β_1 , β_2 , β_3 e β_7 , essendo le β_2 e le β_7 esclusive dei globuli bianchi [18]. Le **integrine β_2** , in particolare, sono ampiamente coinvolte nei fenomeni adesivi sottesi al ruolo cruciale dei leucociti polimorfonucleati neutrofili (PMN) nella difesa dell'organismo da agenti infettivi piogeni, come pure nella patogenesi del danno tissutale.

Studi condotti parallelamente, vuoi mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali (mAb) specifici, vuoi tramite l'analisi dei difetti funzionali in pazienti con ridotta espressione di integrine β_2 , hanno permesso di evidenziare come queste molecole, modulando morfologia, motilità e adesività dei PMN, entrino in gioco sostanzialmente in ogni aspetto della funzionalità di tali cellule: dal primo fermo contatto all'endotelio

vascolare alla migrazione verso il focolaio infiammatorio in risposta a stimoli chemiotattici; dalla fagocitosi del microorganismo patogeno alla degranolazione, che esitano nel rilascio di enzimi proteolitici e specie tossiche dell'ossigeno responsabili del danno tissutale rilevabile in svariati quadri patologici [1, 2, 6, 8]. Il difetto di adesione leucocitaria (LAD) di tipo I, rara malattia autosomica recessiva determinata dalla ridotta o mancata espressione di integrine β_2 , è così caratterizzato da infezioni batteriche ricorrenti e spesso fatali che insorgono nei primi anni di vita e sono ascrivibili per lo più ad una scarsa mobilitazione dei granulociti e monociti [8, 19]; rare sono invece le manifestazioni cliniche imputabili a difetti a carico dei linfociti; le β_2 sembrano infatti avere un ruolo prettamente accessorio nella funzionalità linfocitaria, intervenendo comunque nella proliferazione dipendente da contatto intercellulare, come pure nell'aggregazione dei linfociti B e nella produzione di anticorpi, o nell'attività citotossica delle cellule T [5, 8, 19-22]. Ancora, l'iperespressione di integrine β_2 è riscontrabile in parecchi disordini infiammatori associati ad attivazione dei PMN e può contribuire alla neutropenia e al danno microvascolare [8]. In quest'ottica le β_2 vanno considerate come importanti bersagli per la terapia di svariate malattie: l'utilizzo di mAb specifici che inducano deficienze funzionali di queste molecole di adesione può risultare efficace, ad esempio, nella limitazione del danno da riperfusione dopo ischemia [23, 24], come pure nel prevenire il rigetto dei trapianti in combinazione con la terapia immunosoppressiva [25].

3. Integrine β_2 : distribuzione ed espressione

I quattro membri della sottofamiglia β_2 (α_L , α_M , α_X e $\alpha_d\beta_2$), le cui caratteristiche principali sono riassunte nella *Tabella I*, vengono comunemente definiti **integrine leucocitarie** ma, ad eccezione di $\alpha_L\beta_2$, non sono rappresentati su tutti i tipi di leucociti: $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$ hanno infatti una distribuzione limitata a monociti/macrofagi, granulociti e cellule NK [8], mentre $\alpha_d\beta_2$, addirittura, è stata sinora identificata solo su specifiche sottopopolazioni di linfociti T e macrofagi tissutali [26].

L'entità della loro espressione non varia solamente a seconda del tipo di cellula, ma anche del suo stato di attivazione e differenziazione; così, nei monociti circolanti $\alpha_L\beta_2$ e $\alpha_M\beta_2$ sono le più rappresentate, mentre nei macrofagi tissutali diventa predominante $\alpha_X\beta_2$

[27, 28]; ancora, nei granulociti è $\alpha_M\beta_2$ la più espressa ed in seguito ad attivazione cellulare il divario con le altre due aumenta ulteriormente [29].

Quantità non trascurabili di $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$ si ritrovano sequestrate nei granuli secondari e terziari dei granulociti circolanti, come pure nelle vescicole intracellulari e nei granuli perossidasi negativi dei monociti [28-32]. Per questo motivo, qualora tali cellule vengano opportunamente stimolate, si può verificare un aumento anche considerevole dell'esposizione in superficie delle due integrine; i granuli vengono infatti traslocati a livello della plasmamembrana e successivamente si fondono con essa. Questa possibilità di modulazione dell'espressione non sussiste invece per $\alpha_L\beta_2$, i cui depositi intracellulari, se presenti, sono comunque assai scarsi [28, 29].

Oltre all'entità di espressione delle integrine leucocitarie, risultano molto importanti per i riscontri funzionali la loro distribuzione superficiale e la mobilità relativa nel piano della membrana. Si sa ad esempio che PMN e monociti sono dotati di due distinte popolazioni di $\alpha_M\beta_2$: una quota immobile, saldamente ancorata al citoscheletro, che sembra coinvolta nella fagocitosi ed una mobile responsabile del legame al C3bi; questi *pool* sarebbero distribuiti in maniera uniforme e casuale nei PMN a riposo ma, dopo attivazione e contatto con superfici adesive, la quota immobile verrebbe a trovarsi nella parte apicale della cellula, mentre quella mobile si aggregerebbe in maniera reversibile nelle aree di contatto con il substrato [33, 34]. Altri dati, ottenuti da studi sui macrofagi, documentano poi una maggiore mobilità di $\alpha_M\beta_2$ rispetto ad $\alpha_X\beta_2$, che esiterebbe in un'interazione più efficace della prima integrina con il loro ligando comune C3bi [35]. Per quanto riguarda $\alpha_L\beta_2$, essa si ritrova aggregata assieme al recettore delle cellule T dei linfociti T *helper* nella porzione di membrana in diretto contatto con i linfociti B presentanti l'antigene [36]. La sua associazione basale con il citoscheletro varierebbe in seguito ad attivazione cellulare: dopo un iniziale distacco e conseguente mobilizzazione nel piano della membrana, $\alpha_L\beta_2$ si concentrerebbe infine nei punti di contatto con il substrato, instaurando con il citoscheletro nuove e più salde connessioni [37]. Questo processo sarebbe regolato da flussi di calcio indotti dallo stimolo, mediante l'attività della proteasi Ca^{2+} -dipendente calpaina; tale enzima agirebbe infatti su molecole chiave coinvolte nella trasduzione del segnale (PKC, FAK, pp60^{src} ecc.) e su proteine citoscheletriche (α -actinina, talina, actina ecc.), il cui taglio porterebbe all'iniziale disancoraggio di $\alpha_L\beta_2$ dal citoscheletro e successivo *clustering* [38].

Tabella I. Integrine β_2

Struttura	Sinonimi	Peso molecolare	Distribuzione	Ligandi
$\alpha_L\beta_2$	CD11a/CD18; LFA-1	180 kD/95 kD	Linfociti B e T; monociti; macrofagi; granulociti; cellule NK	ICAM-1; ICAM-2; ICAM-3; CI; FN
$\alpha_M\beta_2$	CD11b/CD18; CR3; Mac-1; Mo1	165 kD/95kD	Monociti; macrofagi; granulociti; cellule NK	C3bi; ICAM-1; ICAM-2; FBG; FN; LPS; fattore X; HMWK; eparina; glucani
$\alpha_X\beta_2$	CD11c/CD18; CR4; gp150,95	150 kD/95 kD	Monociti; macrofagi; granulociti; cellule NK; alcune linee tumorali linfocitiche	C3bi; FBG; LPS; ICAM-3; FN
$\alpha_d\beta_2$	CD11d/CD18	?/95 kD	Specifiche sottopopolazioni di macrofagi tissutali; una sottopopolazione minore di linfociti CD8 ⁺ [26]	ICAM-3 [39]

Abbreviazioni: ICAM, *intercellular adhesion molecule*; CI, collagene di tipo I; FN, fibronectina; C3bi, frammento proteolitico della proteina del complemento C3; FBG, fibrinogeno; LPS, lipopolisaccaride; HMWK, chininogeno ad alto peso molecolare.

4. Struttura delle integrine β_2 : omologie e differenze*

Entrambe le subunità costituenti l'eterodimero integrinico β_2 sono proteine transmembranarie che attraversano il doppio strato fosfolipidico una sola volta (*one-spanning*) e sono caratterizzate da una porzione extracellulare N-terminale molto ampia e una breve regione citoplasmatica C-terminale [2, 40].

Le subunità α presentano in media un alto grado di omologia fra loro (~ 40 %, rispetto al 25-30 % di omologia con le subunità α di altre integrine) e ciò fa supporre che i tre geni distinti che le codificano, organizzati in *cluster* sul cromosoma 16, derivino da un unico gene primordiale [8, 40]. L'omologia di sequenza è massima tra $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$ (63 %) e si riflette nelle documentate somiglianze funzionali tra questi due recettori (ad esempio, la capacità di legare il C3bi) [8, 41, 42].

Nella porzione extracellulare delle subunità α si individuano due regioni distintive coinvolte nell'interazione con i ligandi e rappresentate da:

* Considerate le ancora scarse conoscenze su $\alpha_d\beta_2$ e la sua estraneità alle problematiche affrontate in questa tesi, si è scelto di limitare la trattazione successiva alle tre integrine leucocitarie principali.

1. sette ripetizioni omologhe *in tandem*, ciascuna lunga ~ 60 aa, di cui la V, VI e VII contengono il nanopeptide consenso per il legame di ioni metallici. Nel loro insieme costituirebbero il cosiddetto β propeller, una struttura ciclica modulare con la faccia superiore dotata di siti di riconoscimento per il ligando e quella inferiore, caratterizzata da motivi aminoacidici leganti il Ca^{2+} , importante nella connessione con lo «stelo» portante della subunità [8, 43].
2. un'ampia inserzione di ~ 200 aa tra la II e la III ripetizione del β propeller detta I^* -(o A^{**} -) domain, contenente la sequenza MIDAS (*Metal Ion-Dependent Adhesion Site*) che costituisce una sfera di coordinazione per cationi divalenti [8, 43, 46]. Prima ancora che ne fosse dimostrata l'importanza nel riconoscimento del ligando [47-50], il coinvolgimento dell'*I-domain* era stato ipotizzato sulla base dell'elevata omologia con un dominio conservato e ripetuto una o più volte in parecchie proteine coinvolte in interazioni adesive (fattore di von Willebrand, VLA2, fattore B del complemento ecc.) ed effettivamente responsabile del legame al bersaglio [8].

La regione transmembranaria delle subunità α è altamente conservata e potrebbe avere un ruolo critico non solo nella stabilizzazione del complesso α - β ma anche nella trasduzione del segnale mediato dall'integrina stessa [8].

Il dominio citoplasmatico include parecchi residui di serina e treonina che rappresentano potenziali siti di fosforilazione. Come nella maggiorparte delle integrine, esso è breve: raggiunge i 53 aa in α_L , si riduce a 29 aa in α_X e a soli 19 aa in α_M . Queste differenze in lunghezza delle code intracellulari suggeriscono che le tre integrine β_2 instaurino associazioni diverse con componenti citoscheletriche quali proteine leganti l'actina e secondi messaggeri e che ciò permetta loro di mediare funzioni diverse [8, 35, 51].

La **subunità β** comune è caratterizzata da una regione citoplasmatica ridotta (46 aa) ma altamente conservata, anch'essa dotata di numerosi residui fosforilabili che diventano effettivamente bersaglio di chinasi in seguito a stimolazione cellulare.

Anche il dominio transmembranario è molto conservato e merita le stesse considerazioni riportate a proposito del parallelo dominio α [8].

* *Inserted.*

** dall'omologia con il dominio A ripetuto tre volte nel fattore di von Willebrand [45].

Nella porzione extracellulare si distinguono una regione ricca in cisteina, costituita da quattro ripetizioni *in tandem* e, N-terminale rispetto ad essa, un dominio di ~ 250 aa suddiviso in quattro segmenti nei quali si raggiunge un elevato grado di identità con le altre catene β ; questa ed altre evidenze suggeriscono che tale dominio medi funzioni comuni ed essenziali quali la formazione dell'eterodimero e, soprattutto, il riconoscimento del ligando [8, 52, 53]; poichè è probabile che sia strutturalmente e funzionalmente correlato all'*I-domain* delle subunità α , esso è chiamato *β I-like domain* [43].

5. Attivazione integrinica e riconoscimento del ligando: ruolo dei cationi divalenti

La modulazione dell'espressione integrinica, ove possibile, non è comunque l'unico strumento con cui il leucocita può variare le sue proprietà adesive; la funzionalità delle integrine β_2 non è infatti costitutiva, bensì sotto il controllo di segnali intracellulari indotti da svariati mediatori infiammatori (TNF, C5a, fMLP, PAF ecc.) o da agenti non fisiologici quali gli esteri del forbolo [2, 54-56].

I messaggi provenienti dall'interno della cellula (*inside-out signalling*) modificano in qualche modo la struttura integrinica agendo direttamente (mediante fosforilazione) o indirettamente (inducendo l'associazione con determinate componenti citoscheletriche) sulle code citoplasmatiche dell'eterodimero; esso va quindi incontro a cambiamenti conformazionali che dall'ambiente intracellulare si ripercuotono a livello extracellulare ed esitano in un efficace riconoscimento del ligando [2, 57]. Il passaggio dell'integrina da uno stato di bassa affinità per il suo bersaglio ad uno di alta affinità sarebbe dovuto a due possibili meccanismi, eventualmente coesistenti [43]:

- a) un movimento di domini extracellulari con conseguente «smascheramento» dei siti di legame quali il *β propeller*; a questo proposito è stato ipotizzato che modificazioni della struttura quaternaria dell'integrina possano avere un ruolo decisivo: il *β I-like domain*, che giacerebbe sul *β propeller* nel conformero integrinico a bassa affinità, si staccerebbe da esso permettendone un'adeguata esposizione.
- b) cambiamenti nella struttura terziaria dei siti di legame stessi, che altererebbero forma e proprietà elettrostatiche della superficie interagente con il ligando; esistono evidenze di questo genere per quanto riguarda l'*I-domain* di $\alpha_M\beta_2$, che assumerebbe due diverse strutture cristalline in base al tipo di ioni metallici legati [44].

Le interazioni delle integrine β_2 con i propri ligandi dipendono sempre dalla presenza di cationi divalenti; in particolare, è dimostrato che Mg^{2+} e Mn^{2+} promuovono il legame mentre il Ca^{2+} ha un effetto inibitorio [46, 58, 59]. Esistono di fatto sequenze di riconoscimento per cationi divalenti in tutti i siti di legame finora identificati (β propeller e *I-domain* sulla subunità α ; β *I-like domain* sulla catena β); tali sequenze non sono però identiche fra loro e questa eterogeneità fa sì che siti diversi leghino preferibilmente uno o più cationi rispetto ad altri (ad esempio, l'*I-domain* esprime affinità di legame decrescente per i seguenti cationi: $Mn^{2+} > Cd^{2+} > Mg^{2+} >> Ca^{2+}$ [60]); si è visto inoltre che il legame di un catione può influenzare l'affinità di un altro per il suo sito specifico [58]. Il ruolo regolatorio dei cationi può essere duplice:

1. diretto, qualora facciano da «ponte» nell'interfaccia tra ligando e sequenza di riconoscimento sull'integrina; ciò potrebbe verificarsi a livello dell'*I-domain* di α_L , la cui struttura non viene alterata dal legame di questo o quel catione, ma che necessita comunque della loro presenza per riconoscere il bersaglio [61];
2. indiretto, come sembra accada per l'*I-domain* di $\alpha_M\beta_2$, nel caso inducano modificazioni conformazionali dei siti di interazione con il ligando agendo da punti distali [44, 58, 62].

Gli ioni metallici sono quindi senz'altro coinvolti nella regolazione della funzionalità integrinica, non solo nell'ambito dei processi di attivazione innescati dall'interno della cellula ma, per il loro ruolo fondamentale nel mediare modificazioni conformazionali e nel creare un assetto di cariche che favorisce l'interazione con il ligando, possono anche agire come «attivatori esterni» dell'integrina persino in assenza di una segnalazione *inside-out* [58-60, 62].

6. Meccanismi d'azione di anticorpi monoclonali che alterano la funzionalità integrinica

L'identificazione e lo studio dei siti di interazione con il ligando sull'eterodimero $\alpha\beta$ si sono spesso avvalsi dell'utilizzo di mAb in grado di compromettere o esaltare le proprietà adesive della molecola integrinica. Così, l'individuazione di **mAb inibitori** ha consentito o facilitato la mappatura degli epitopi critici nel fenomeno di attivazione; non sempre questi mAb agiscono competendo con il ligando per il medesimo sito d'attacco (e quindi perturbando la «tasca» di legame) ma possono altresì indurre o stabilizzare un conformero integrinico a bassa affinità per il ligando stesso; in sostanza, impedendo quei

cambiamenti strutturali necessari ad un'interazione $\alpha\beta$ -ligando pienamente efficiente, si comporterebbero come regolatori allosterici negativi della funzionalità integrinica [2, 58].

Analogamente, i **mAb stimolatori** possono indurre in maniera diretta modificazioni conformazionali del sito di legame, simulando l'interazione con il ligando naturale. Alternativamente, riconoscendo epitopi sensibili all'occupazione da parte di cationi, possono orientare la struttura integrinica verso una conformazione più competente a legare il bersaglio [58, 63, 64].

Le integrine sono da considerarsi molecole flessibili, in cui le variazioni cationiche regolano il movimento a perno delle subunità α e β intorno a regioni «cardine», con conseguente effetto diretto sul riconoscimento del ligando. L'interazione con il ligando innesca a sua volta una cascata di modificazioni conformazionali che si propaga alla membrana e la attraversa trasmettendosi alle code citoplasmatiche; a questo livello intervengono infine i fenomeni di associazione con componenti citoscheletriche e secondi messaggeri per la trasduzione del segnale integrina-dipendente (*outside-in signalling*) [2]. In generale, gli anticorpi capaci di alterare la funzionalità integrinica riconoscono proprio i siti regolatori della funzionalità che sono sotto il controllo di cationi e ligandi; sembra cioè che tali mAb stabilizzino o perturbino gli equilibri conformazionali fondamentali nel determinare i livelli di attivazione e inattivazione [58, 65].

7. Cambiamenti di affinità e avidità come effetto dell'attivazione delle integrine β_2

L'attivazione delle molecole integriniche si riflette in un aumento di affinità o di avidità per il ligando, fenomeni che non si escludono a vicenda ma il cui contributo varia probabilmente a seconda dell'integrina e del tipo cellulare considerato [2, 66].

Una modificazione dell'**affinità** presuppone necessariamente una variazione strutturale intrinseca all'eterodimero che si traduce in una forza di legame più o meno intensa; sono stati caratterizzati differenti stati di affinità per integrine appartenenti a varie sottofamiglie, tra le quali $\alpha_1\beta_2$ [67].

La modulazione dell'**avidità** implica invece un cambiamento dell'efficienza funzionale di una popolazione integrinica nel suo complesso, più che della singola molecola; l'avidità è verosimilmente promossa dall'aggregazione o multimerizzazione delle integrine nel piano della membrana, in forma di piccoli complessi focali [66, 68, 69].

Sono state documentate variazioni di avidità sia per $\alpha_L\beta_2$ che per $\alpha_M\beta_2$ [34, 66] il cui meccanismo molecolare, tuttavia, rimane ancora da chiarire. In particolare per $\alpha_L\beta_2$, che non è iperesprimibile, l'aumento di avidità sarebbe riconducibile all'aggregazione di questi recettori nelle porzioni di membrana a contatto con il substrato adesivo [37, 66]; alternativamente, applicando il concetto di avidità non alla totalità della popolazione espressa ma alla singola molecola integrinica, lo stesso incremento sarebbe imputabile a cambiamenti strutturali dell'integrina [70, 71] con esposizione di un maggior numero di siti di legame, tra cui presumibilmente l'*I-domain*. Quest'ultimo può essere considerato infatti come sito di legame addizionale più che alternativo, mancando di fatto nella maggior parte delle integrine [58]; in seguito ad attivazione esso diventerebbe pienamente funzionale, determinando un cambiamento quantitativo, oltre che qualitativo, nella capacità di $\alpha_L\beta_2$ di interagire con il ligando [18, 37].

Analogamente, sarebbero proprio determinati cambiamenti conformazionali a rendere più avida $\alpha_M\beta_2$; l'aumento di espressione di quest'integrina in seguito a stimolazione, non seguendo le medesime cinetiche dell'aumento di adesione cellulare, sarebbe invece estraneo al fenomeno [72, 73].

E' stato ipotizzato che le integrine β_2 in generale siano specializzate per un'interazione con il ligando ad alta avidità e che solo in certe circostanze prevalga il fenomeno di aumentata affinità [37]; è comunque plausibile che in presenza di ligandi in fase fissa e di opportuni stimoli attivatori i due fenomeni coesistano e cooperino all'espressione massimale delle capacità adesive della cellula. Infine, a sostegno di un modello in cui la regolazione dell'avidità delle integrine β_2 dipende da cambiamenti strutturali diretti delle regioni extracellulari, esistono evidenze sulla capacità di specifici cationi divalenti [58-60, 62] e mAb [74, 75] nell'aumentare l'adesività integrinica anche in assenza di un'attivazione *inside-out*.

8. Integrine β_2 e cooperazioni interrecettoriali

Le integrine leucocitarie sono in grado di associarsi fisicamente con altre molecole di superficie ed instaurare con esse rapporti funzionali che possono avere un ruolo critico per la stessa attivazione integrinica, per la trasduzione del segnale *outside-in* e per le conseguenti risposte cellulari [76].

E' ben documentata, ad esempio, l'associazione con diversi recettori appartenenti alla famiglia di proteine di membrana *GPI-anchored* (cioè legate al foglietto esterno della membrana plasmatica via glicosil fosfatidil inositolo). Essendo prive di porzione intracellulare, tali molecole non sono di per sé capaci di trasdurre segnali ma, associandosi ad un integrina, possono sfruttare la sua coda citoplasmatica per trasmettere alla cellula l'informazione ricevuta dall'esterno sotto forma di legame con il proprio bersaglio; in questo modo l'apparato segnalatorio integrinico non rimane al servizio esclusivo del riconoscimento specifico β_2 -ligando, ma viene condiviso con altre molecole recettoriali divenendo strumento di trasduzione «in comune» [77-79].

Bisogna tuttavia sottolineare che sembra esistere una sorta di selettività: queste associazioni dipendono infatti dal tipo leucocitario, essendo ristrette alla linea mieloide e mancando di fatto nella serie linfocitaria [80].

Nei PMN è esemplificativa la cooperazione tra $Fc\gamma RIIIB$ e $\alpha_M\beta_2$ per l'innescò del *burst* ossidativo $Fc\gamma RII$ -dipendente. Integrina e proteina *GPI-anchored* sembrano costitutivamente associate tramite l'interazione di un residuo oligosaccaridico esposto da $Fc\gamma RIIIB$ con un sito lectino-simile su $\alpha_M\beta_2$ [79]; il reclutamento contemporaneo dei due recettori esiterebbe nell'attivazione di $Fc\gamma RII$, con conseguente assemblaggio della NADPH ossidasi* e generazione di anione superossido (O_2^-). In particolare, l'impegno della sola $\alpha_M\beta_2$ indurrebbe l'aggancio di $Fc\gamma RII$ al citoscheletro actinico, mentre la co-ligazione di $Fc\gamma RIIIB$ sarebbe necessaria alla fosforilazione in tirosina di $Fc\gamma RII$ stesso (o di qualche substrato prossimale), fenomeni entrambi essenziali per la sua attivazione [81].

Anche per $\alpha_L\beta_2$ è stata dimostrata l'associazione fisica, via ponte oligosaccaridico, con $Fc\gamma RIIIB$ [79], ma ne sono ancora sconosciute le implicazioni funzionali.

Le interazioni fisiche e funzionali tra integrine β_2 e recettori *GPI-anchored* non sono necessariamente statiche ma possono anzi rivelarsi transienti e dinamiche, come avviene per l'associazione di $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$ con il recettore per l'attivatore del plasminogeno tipo urochinasi (uPAR o CD87). E' stato visto infatti che, quando i PMN iniziano la locomozione, $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$ si spostano rispettivamente agli uropodi ed ai lamellipodi; contemporaneamente, uPAR si dissocia da $\alpha_M\beta_2$ e si accumula ai lamellipodi attraverso

* Si tratta del complesso enzimatico responsabile della formazione di O_2^- , H_2O_2 e altre specie tossiche dell'ossigeno nei fagociti. E' formata da quattro componenti: due sono molecole transmembranarie (gp91^{phox} e p22^{phox}; insieme costituiscono il citocromo b558) immagazzinate nelle vescicole secretorie e nei granuli

ripetute interazioni con $\alpha_X\beta_2$. In sostanza, questa proteina *GPI-anchored* oscilla tra due diverse integrine dipendentemente dall'attività cellulare [76, 78]; questa duplice cooperazione contribuirebbe a modulare adesione, chemiotassi e altre risposte leucocitarie, pare attraverso variazioni delle concentrazioni del calcio intracellulare e fenomeni di tirosin-fosforilazione [78, 80].

Una dinamicità simile caratterizza l'associazione tra $\alpha_M\beta_2$ e CD14 (recettore per il lipopolisaccaride, LPS): in PMN in sospensione ed in presenza del complesso LPS-LBP (proteina legante LPS) essi interagiscono, ma l'associazione viene meno quando le cellule vanno incontro a *spreading*; sembra che proprio questo legame transiente induca un aumento di adesione mediato da $\alpha_M\beta_2$ e si può speculare che anche CD14, analogamente ad uPAR, dopo essersi dissociato da $\alpha_M\beta_2$ contatti $\alpha_X\beta_2$ per indurre altre risposte cellulari quali la produzione di citochine e la fagocitosi [83].

Oltre a cooperare con i recettori *GPI-anchored* le integrine β_2 possono associarsi con altri tipi di molecole; ad esempio $\alpha_M\beta_2$, ma non $\alpha_X\beta_2$ né $\alpha_L\beta_2$, può interagire fisicamente e funzionalmente con Fc γ RIIA [51], come pure con Fc γ RIIIB in forma solubile [84]. Ancora, nei monociti è stata dimostrata la cooperazione tra $\alpha_M\beta_2$ e CR1 (recettore per il complemento di tipo I) nel legare particelle opsonizzate con C3b; CR1 medierebbe un'iniziale e transiente adesione delle particelle alle cellule e, attraverso la sua attività intrinseca come cofattore del fattore I del complemento (che riduce il C3b a C3bi) faciliterebbe la generazione del ligando per $\alpha_M\beta_2$ (C3bi). Questo processo porterebbe ad un'adesione stabile delle particelle via $\alpha_M\beta_2$ e ciò consentirebbe la successiva fagocitosi [85].

In generale, il fenomeno della fagocitosi vede coinvolti vari tipi di cooperazione interrecettoriale, tra cui suscitano particolare interesse quelli tra membri diversi delle integrine β_2 o, addirittura, tra sottopopolazioni differenti dello stesso tipo di integrina.

Così, nei macrofagi sembra esserci sinergismo tra $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$: entrambe le integrine sono riconosciute come recettori per il C3bi ma poichè su tali cellule $\alpha_M\beta_2$ è più mobile, anche se meno espressa, di $\alpha_X\beta_2$, il primo contatto con le particelle opsonizzate avverrebbe proprio via $\alpha_M\beta_2$; in seguito la fagocitosi sarebbe invece mediata principalmente da $\alpha_X\beta_2$, meno mobile ma molto più rappresentata sulla superficie cellulare [35].

specifici [82] delle cellule a riposo, che vengono traslocate sulla plasmamembrana in seguito a stimolazione cellulare; gli altri due componenti sono proteine citosoliche (p47^{phox} e p67^{phox}).

Analogamente, le due diverse sottopopolazioni di $\alpha_M\beta_2$ identificate su PMN e monociti (vedi cap. 3) coopererebbero nel processo di fagocitosi mediando l'una (la più mobile) il legame delle particelle opsonizzate con C3bi, l'altra l'ingestione vera e propria [33].

L'esistenza di simili sinergie tra integrine fa supporre che anche la dimostrata associazione fisica sui PMN tra $\alpha_L\beta_2$ e $\alpha_M\beta_2$ [79], non basata comunque su interazioni oligosaccaridiche, abbia precisi riscontri funzionali ancora da indagare.

9. Ruolo delle integrine β_2 nelle funzioni dei PMN dipendenti dall'adesione

L'interazione dei neutrofili con un substrato solido è fondamentale per l'innescare di molteplici funzioni; la stimolazione da parte di svariati agonisti solubili induce infatti nei PMN aderenti ad appropriate superfici risposte non ottenibili in sospensione, quali il riarrangiamento citoscheletrico e successivo *spreading*, la produzione di specie tossiche dell'ossigeno o il rilascio di costituenti dei granuli specifici [6]. Tutto ciò rientra nella «logica comportamentale» dei PMN come cellule infiammatorie: da una condizione di relativa inerzia funzionale, auspicabile quando sono in circolo, passano ad uno stato di piena attività nel momento in cui, attraverso una cascata di eventi adesivi, fuoriescono dal torrente ematico e raggiungono il focolaio di flogosi [1].

Rimane comunque aperto l'interrogativo su quale sia l'effettivo contributo dell'adesione nel mediare le succitate funzioni. Essa potrebbe infatti potenziare, facilitandoli, i segnali innescati dagli agonisti solubili attraverso il legame ai propri recettori, ma potrebbe anche mediare segnali del tutto indipendenti che agirebbero in sinergia con i primi; infine, l'interazione con un substrato adeguato potrebbe essere in realtà l'unico fattore determinante l'attivazione funzionale ed il ruolo degli agonisti si ridurrebbe così a quello di semplici induttori dell'adesione cellulare [6].

Sono stati identificati diversi stimoli che attivano funzioni selettive dei PMN aderenti, tra cui TNF, GM-CSF, G-CSF e fMLP [86-92]. Il ruolo del TNF, in particolare, è stato investigato in maniera approfondita; questa citochina agisce legandosi alla cellula attraverso due recettori strutturalmente e funzionalmente differenti: il TNF-R55 (o p55, di 55kD), a bassa affinità, ed il TNF-R75 (o p75, di 75 kD), ad alta affinità [93]. Almeno per quanto riguarda la stimolazione del metabolismo ossidativo dei PMN, esistono evidenze

circa la capacità diretta del p55 di segnalare per la risposta cellulare; il p75 ricoprirebbe invece un ruolo ancillare, forse come modulatore del legame del TNF al p55 stesso [87].

Parecchi studi hanno stabilito che la produzione di O_2^- indotta dal TNF in PMN aderenti dipende dal riarrangiamento del citoscheletro e dallo *spreading* [85, 94, 95], che non sono però gli unici fattori determinanti per l'assemblaggio dell'NADPH ossidasi attiva. Appaiono infatti altrettanto necessari sia l'aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare (che si colloca a valle delle modificazioni citoscheletriche) sia l'esocitosi di una sottopopolazione di granuli specifici contenenti lattoferrina e, presumibilmente, i componenti dell'ossidasi gp91^{phox} e p22^{phox} (vedi nota a pag. 12) [96].

Il *burst* ossidativo che il TNF è in grado di indurre in PMN adesi a diverse superfici biologiche dipende da integrine β_2 [91, 97, 98]. Sebbene i classici recettori per FN, LM e altre proteine della matrice extracellulare appartengano alla sottofamiglia β_1 , queste integrine non sembrano tuttavia implicate nella produzione di O_2^- [97]; invece, dopo stimolazione dei PMN con TNF, non solo si osserva associazione tra la porzione citoplasmatica della catena β_2 e la proteina citoscheletrica α -actinina [99] ma ci sono pure evidenze, ancora indirette, sull'interazione tra β_2 , p125^{FAK} e tirosin chinasi appartenenti alla famiglia Src, che rappresentano un importante anello di congiunzione nella via di trasduzione del segnale che porta all'attivazione dell'NADPH ossidasi [3, 95].

Effettivamente è stato dimostrato che il *crosslinking* delle integrine β_2 induce tirosin-fosforilazione di proteine che vanno a localizzarsi nella medesima frazione citoscheletrica in cui si ritrovano le stesse integrine leucocitarie ed i componenti dell'ossidasi [100-103]; tutto ciò suggerisce che le β_2 modulino l'organizzazione di complessi segnalatori corticali basati sulla nucleazione di proteine citoscheletriche [3, 16].

Analizzando poi il ruolo di ciascuna delle tre integrine β_2 espresse dai PMN, nella funzione respiratoria, esistono alcune evidenze circa il coinvolgimento differenziale di $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$. Ad esempio, $\alpha_M\beta_2$ medierebbe la fosforilazione in tirosina della paxillina [101] ed il rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari [104, 105], ma non sarebbe di per sé in grado di segnalare per la produzione di O_2^- in un sistema privo di agonisti solubili [81, 106]; vi sono invece prove sulla capacità di $\alpha_L\beta_2$ di innescare il *burst* ossidativo quando impegnata nell'interazione con un ligando naturale come il CI [107] o con mAb specifici in fase fissa []; anche $\alpha_X\beta_2$ sembra in grado di mediare la produzione di O_2^- indipendentemente dalla presenza di agonisti solubili, ovvero in PMN piastrati su

mAb immobilizzati [106] o in neutrofilo a contatto con piastrine attivate che espongono fibrinogeno sulla loro superficie [108].

SCOPO DELLA TESI

La funzionalità dei neutrofili infiammatori è il risultato dell'integrazione di due tipi di segnali: quelli innescati dai fattori solubili e quelli inviati dalla MEC. Ciò è particolarmente vero nel caso dell'attivazione metabolica indotta dal TNF: essa non può prescindere dall'adesione delle cellule ad un substrato solido.

Poiché questa adesione dipende principalmente da integrine β_2 , lo scopo di questa tesi è stato quello di:

1. individuare la o le integrine leucocitarie ($\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_X\beta_2$) capaci di trasdurre al neutrofilo stimolato con TNF il segnale per la produzione di O_2^- ;
2. indagare circa il ruolo del TNF nel metabolismo ossidativo, ovvero chiarire se la citochina agisce come mero attivatore dell'adesione cellulare o se contribuisce al *burst* anche in modo diretto, innescando segnali intracellulari indispensabili alla piena espressione della funzione respiratoria.

MATERIALI E METODI

1. Isolamento dei leucociti polimorfonucleati neutrofilici (PMN) da sangue umano periferico

MATERIALI

- ♦ **PBS:** soluzione salina tamponata (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄·2 H₂O 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, pH 7.4; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA).
- ♦ **Anticoagulante:** Na₄·EDTA (acido etilen diammino tetraacetico, sale tetrasodico) 40 mM in PBS.
- ♦ **Percoll:** sospensione madre di Percoll (Percoll, Pharmacia, Uppsala, Svezia) diluita con PBS 10 volte concentrato (3.07 osmolale) e acqua distillata apirogena per ottenere una sospensione al 75 % (densità 1.103 g/ml) in PBS e una sospensione al 62 % (densità 1.078 g/ml) in PBS.
- ♦ **Tampone HEPES:** NaCl 140 mM, KCl 5 mM, HEPES 5 mM, glucosio 5 mM, BSA (Albumin, Bovin Fraction V Solution 35 %; Sigma) 0.2 %, pH 7.4.
- ♦ **Tampone HEPES•ioni:** tampone HEPES contenente CaCl₂ 1 mM e MgCl₂ 1 mM.
- ♦ **Tampone HEPES•EDTA:** tampone HEPES contenente EDTA 1 mM.
- ♦ **Soluzione ipotonica:** tampone fosfato 1 mM, pH 7.4.
- ♦ **Soluzione ipertonica:** NaCl 1.3 % in tampone fosfato 1 mM, pH 7.4.

Tutte le soluzioni venivano preparate utilizzando acqua distillata apirogena Baxter (Laboratori Don Baxter Spa Trieste).

METODO

Il sangue periferico, prelevato a donatori sani, veniva raccolto in una provetta contenente EDTA (concentrazione finale: 4 mM) per impedirne la coagulazione. Nel frattempo venivano allestiti uno o più gradienti discontinui di Percoll, ciascuno formato da 4 ml di Percoll al 75 % e 4 ml di Percoll al 62 %; su ogni gradiente venivano stratificati 4 ml di sangue e le provette venivano quindi centrifugate a 20°C per complessivi 25 minuti così ripartiti:

10 minuti a 200 x g;

15 minuti a 400 x g.

In questo modo si otteneva la separazione delle cellule in base alle loro densità e dimensioni: gli eritrociti e la maggior parte dei granulociti eosinofili si depositano infatti sul fondo della provetta; i granulociti neutrofilo si concentrano all'interfaccia tra Percoll 75 % e Percoll 62 %; i linfomonociti si localizzano tra Percoll 62 % e plasma.

Dopo aver eliminato plasma e linfomonociti, la banda contenente i granulociti neutrofilo veniva prelevata, raccolta in provetta e lavata in tampone HEPES mediante centrifugazione a 250 x g per 7 minuti, a 20°C. Per eliminare gli eventuali globuli rossi contaminanti la preparazione, le cellule venivano risospese in alcuni ml di soluzione ipotonica (la quantità esatta si sceglieva di volta in volta a seconda del grado di contaminazione). Dopo 10 secondi l'isotonicità del mezzo veniva ristabilita aggiungendo soluzione ipertonica (7 ml ogni 3 ml di soluzione ipotonica). La sospensione cellulare veniva nuovamente centrifugata per 7 minuti a 250 x g ed il fondello ottenuto veniva risospeso in 1 ml di tampone HEPES. Le cellule venivano contate con un contaglobuli elettronico (Coulter Counter, modello ZBI ; Coulter Electronics, LTD. Luton, BEDS, Inghilterra) e la sospensione veniva infine diluita in tampone HEPES per portarla alla concentrazione cellulare desiderata.

La popolazione ottenuta, caratterizzata mediante conta differenziale di citocentrifugati colorati con Diff-Quik (Harleco, Duedingen, Switzerland), era costituita per il 92-98 % da granulociti neutrofilo e per il restante 2-8 % da granulociti eosinofili.

2. Rivestimento dei pozzetti

MATERIALI

- ♦ **Moduli di polistirene** da 16 pozzetti a fondo piatto di 6.4 mm di diametro (F16 MaxiSorp Loose Nunc-Immuno Modules, Nunc, Roskilde, Danimarca).
- ♦ **Moduli di polistirene** da 8 pozzetti a fondo piatto di 6.4 mm di diametro, derivatizzati con idrazide (HZ) (Carbohydrate Binding 8 well Strip Plates, Corning Costar Corp.; Cambridge, MA, U.S.A.).
- ♦ **Piastre per colture cellulari** da 24 pozzetti (Nunc).
- ♦ **PBS.**
- ♦ **Etanolo** assoluto (Merck, Darmstad, Germania).

- ♦ *Glutaraldeide* (Sigma) 2.5 % in PBS.
- ♦ *NH₄Cl* 50 mM in H₂O distillata.
- ♦ *Caseina* (Merck) 2 mg/ml in PBS.
- ♦ *Fibronectina (FN)* plasmatica umana, purificata nel nostro laboratorio tramite cromatografia di affinità secondo il metodo descritto da Ruoslahti et al. [109].
- ♦ *Fibrinogeno (FBG)* da plasma umano (Sigma).
- ♦ *Collagene di tipo I (CI)* da placenta umana, catalogato dalla ditta produttrice come tipo VIII (Sigma).
- ♦ *Collagene di tipo IV (CIV)* da placenta umana, catalogato dalla ditta produttrice come tipo VI (Sigma).
- ♦ *Laminina (LM)* isolata dalla membrana basale del tumore murino di Englebreth-Holm-Swarm, con grado di purezza > 99 % (Collaborative Biomedical Products, Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, U.S.A.).
- ♦ *Poli(2-idrossietil metacrilato) (MT)* (Sigma).
- ♦ *Proteina G* ricombinante (Sigma).
- ♦ *Anticorpi monoclonali e frammenti F(ab')₂* da essi preparati; nella tabella seguente sono indicati i mAb usati, la loro specificità, la sottoclasse e la provenienza.

Tabella II. Anticorpi monoclonali

mAb	Specificità	Sottoclasse	Provenienza
13	CD29 (β_1)	IgG2a (ratto)	Fornito dal dott. K. Yamada (Nat. Inst. of Health, Bethesda, U.S.A.)
60.3	CD18 (β_2)	IgG2a (topo)	Fornito dal dott. J. M. Harlan (Washington Un., Seattle, WA, U.S.A.)
TS1/18	CD18 (β_2)	IgG1 (topo)	Prodotto nel nostro laboratorio da una linea cellulare della ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.)
TS1/22	CD11a (α_L); epitopo: <i>I-domain</i> [110]	IgG1 (topo)	Prodotto nel nostro laboratorio da una linea cellulare della ATCC
M1/70	CD11b (α_M); epitopo: <i>I-domain</i> [111]	IgG2b (ratto)	Prodotto nel nostro laboratorio da una linea cellulare della ATCC
MY/904	CD11b (α_M); epitopo: sito legante LPS [112]	IgG1 (topo)	Prodotto nel nostro laboratorio da una linea cellulare della ATCC
3.9	CD11c (α_X)	IgG1 (topo)	Fornito dalla dott. N. Hogg (Imperial Cancer Research Fund., London, UK)
BB7.5	HLA A, B, C	IgG1 (topo)	Prodotto nel nostro laboratorio da una linea cellulare della ATCC

METODI

a) Rivestimento con proteine della matrice extracellulare

Le proteine venivano diluite a 20 µg/ml (FN, CI, CIV, LM) o a 500 µg/ml (FBG) in PBS e dispensate nei pozzetti di polistirene (50 µl/pozzetto) o nei pozzetti di piastre per coltura (200 µl/pozzetto), che venivano quindi mantenuti a 37°C per 1 h in un incubatore umidificato. Immediatamente prima dell'inizio delle prove funzionali, i pozzetti venivano lavati riempiendoli con PBS fino all'orlo e poi svuotandoli, operazione che veniva ripetuta per 3 volte di seguito.

b) Rivestimento con metacrilato

Il metacrilato veniva fatto sciogliere al 12 % in etanolo assoluto mantenendo la provetta in rotazione per tutta la notte, a temperatura ambiente. Per eliminare dalla soluzione eventuali precipitati insolubili si effettuava una centrifugazione di 30' a 1.000 x g. Dopo aver dispensato 50 µl della soluzione in ogni pozzetto, il metacrilato veniva fatto polimerizzare ponendo la piastra, perfettamente a bolla, a 37°C per 48h. Le superfici così preparate si potevano conservare a temperatura ambiente per più di un mese; al momento dell'utilizzo i pozzetti venivano semplicemente sciacquati con PBS per pulirli da eventuali tracce di polvere.

c) Rivestimento con anticorpi monoclonali interi

Dopo aver dispensato in ciascun pozzetto 50 µl di mAb a 10 µg/ml in PBS, i moduli venivano lasciati per 1 h a temperatura ambiente, lavati 3 volte con PBS e quindi incubati con FN come descritto nel paragrafo a), allo scopo di saturare la superficie di polistirene eventualmente non rivestita con anticorpi.

d) Rivestimento con $F(ab')_2$

Si procedeva come descritto nel paragrafo precedente, aggiungendo ai pozzetti i frammenti $F(ab')_2$ anziché gli anticorpi monoclonali interi.

e) Rivestimento con proteina G ed immobilizzazione di anticorpi monoclonali interi

L'utilizzo dei pozzetti derivatizzati con HZ consentiva di legare covalentemente ad essi la proteina G, un prodotto di origine batterica (*Streptococcus* del gruppo C) che riconosce ad alta affinità le porzioni Fc dei mAb.

Ogni pozzetto veniva inizialmente trattato con 50 µl di glutaraldeide al 2.5 %. La glutaraldeide è una molecola estremamente reattiva che veniva sfruttata per far da «ponte» tra i gruppi amminici dell'HZ e quelli della proteina G; possedendo due gruppi aldeidici,

essa si lega covalentemente sia ai primi che ai secondi, dando origine a composti stabili. Il trattamento con glutaraldeide si svolgeva a temperatura ambiente e durava 15 minuti.

Dopo 3 lavaggi in PBS (che venivano ripetuti ad ogni passaggio successivo), i moduli venivano incubati per 1 h a temperatura ambiente con 50 µl per pozzetto di proteina G a 5 µg/ml in PBS. Seguiva un trattamento di 15 minuti con 50 µl per pozzetto di NH₄Cl 50 mM; questo passaggio è stato introdotto per neutralizzare le eventuali molecole di glutaraldeide che non avessero reagito completamente con l'HZ e la proteina G ed evitare così l'instaurarsi di legami covalenti non opportuni.

Si procedeva quindi alla saturazione dei siti non occupati della proteina G tramite incubazione a 4°C con caseina a 2 mg/ml (50 µl/pozzetto) per tutta la notte.

Il giorno dopo, in ogni pozzetto si dispensavano 50 µl di mAb a 10 µg/ml in PBS ed i moduli venivano incubati per 1 h a temperatura ambiente. L'eventuale quota di proteina G non impegnata nel legame con le molecole anticorpali veniva saturata grazie ad un'ultima incubazione con FN.

3. Valutazione del legame degli anticorpi alle superfici

MATERIALI

- ♦ **PBS.**
- ♦ **Anticorpo intero** di pecora, coniugato con la perossidasi, diretto contro le IgG di topo (Sigma).
- ♦ **Anticorpo intero** di capra, coniugato con la perossidasi, diretto contro le IgG di ratto (Sigma).
- ♦ **Frammento F(ab')₂** di anticorpo di pecora, coniugato con la perossidasi, diretto contro le IgG di topo (Sigma).

METODO

Per verificare se, e in quale misura, i mAb o F(ab')₂ si fossero effettivamente legati alla superficie dei pozzetti (vuoi per adsorbimento alla plastica, vuoi per interazione con la proteina G), parallelamente ai saggi funzionali veniva allestito di volta in volta un dosaggio immunoenzimatico (ELISA, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Esso consisteva nell'utilizzo di un secondo anticorpo anti Ig di topo o di ratto, coniugato con la perossidasi, che veniva aggiunto ai pozzetti rivestiti con anticorpi (50 µl di Ab diluito, rispettivamente,

1:5000 o 1:1000 in PBS). Dopo 1 h di incubazione a temperatura ambiente e 3 lavaggi in PBS per eliminare l'anticorpo non legato, la reazione enzimatica della perossidasi veniva sviluppata con le stesse modalità che verranno descritte in *Misura dell'adesione* (cap. 7, II; unica differenza: era superflua l'aggiunta di CTAB e di AMT).

L'ELISA per la valutazione del legame dei mAb alla proteina G veniva sviluppato con frammenti $F(ab')_2$ anti IgG di topo coniugati con la perossidasi. L'uso dei $F(ab')_2$ al posto degli anticorpi interi permette infatti di ridurre l'elevata risposta aspecifica rilevabile in assenza del primo anticorpo, determinata dal fatto che anche l'anticorpo coniugato con perossidasi può legarsi attraverso la porzione Fc alla proteina G.

4. Saggi funzionali

I. Valutazione del metabolismo ossidativo

a) Misura della produzione di anione superossido

MATERIALI

- ◆ *Moduli di polistirene* da 16 pozzetti (Nunc).
- ◆ *Moduli di polistirene* da 8 pozzetti, derivatizzati con HZ (Costar).
- ◆ *Citocromo c* di tipo VI, da cuore di cavallo (Sigma).
- ◆ *Fattore di necrosi tumorale di tipo α (TNF)*, prodotto da gene umano nel lievito *Pichia pastoris* (Bissendorf Biochemical, GMBH, Hannover, Germania).
- ◆ *Genisteina* (4', 5, 7-triidrossiisoflavone), di sintesi (Sigma).
- ◆ *Citocalasina B*, da *Helminthosporium dematioideum* (Sigma).
- ◆ *mAb* (vedi *Tab. II* a pag. 20).
- ◆ $F(ab')_2$ ottenuti dai mAb suddetti secondo i metodi descritti al cap. 9.

METODO

I pozzetti, rivestiti come descritto al capitolo 2, venivano riempiti con 100 μ l di tampone HEPES•ioni (o HEPES•EDTA) contenente citocromo c 0.18 mM (0.12 mM finale) e, nelle prove che lo richiedevano: TNF, mAb o frammenti $F(ab')_2$ ad una concentrazione 1.5 volte maggiore di quella finale; genisteina o CB in quantità tali da mantenerne costante la concentrazione usata durante la preincubazione delle cellule in sospensione. I moduli così allestiti venivano riscaldati per 10' a 37°C in un incubatore

umidificato; ad ogni pozzetto venivano poi aggiunti 50 μ l di una sospensione cellulare (1.5×10^6 PMN/ml in HEPES•ioni* o HEPES•EDTA, eventualmente contenenti genisteina 50 μ M o CB 5 μ g/ml) precedentemente portata a 37°C in bagno Dubnoff (10' in agitazione). L'incubazione delle cellule nei moduli si protraeva per altri 45' nell'incubatore a 37°C.

Per valutare il metabolismo ossidativo dei PMN si misurava la quantità di citocromo c ridotto dall'anione superossido (O_2^-) prodotto dalle cellule durante l'incubazione in piastra. Ad intervalli di 15 minuti la piastra veniva prelevata dall'incubatore a 37°C e sottoposta ad analisi spettrofotometrica in un lettore per micropiastre (Multiskan MCC/340, Labsystem Oy, Helsinki, Finlandia) alle lunghezze d'onda di 550 nm e 540 nm, che corrispondono rispettivamente al picco di assorbimento del citocromo c ridotto e al punto isobestico degli spettri di assorbimento del citocromo c ridotto e ossidato. La differenza tra i valori di assorbanza registrati alle due lunghezze d'onda risultava quindi proporzionale alla quantità di citocromo c ridotto.

Nel nostro sistema di lettura, ad una nanomole di citocromo c ridotto corrisponde una differenza di densità ottica di 0.037 unità; poiché la stechiometria della riduzione del citocromo c da parte di O_2^- è di 1:1, allora la quantità di O_2^- prodotta da 10^6 cellule veniva calcolata come segue:

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

dove **n** è il numero di cellule aggiunte in ogni pozzetto.

b) Misura dello *shunt* dei pentosi

MATERIALI

- ♦ **Piastre per colture cellulari** da 24 pozzetti (Nunc).
- ♦ **D-[1-¹⁴C] glucosio** ad attività specifica di 57.0 mCi/mmole, in soluzione acquosa contenente etanolo al 3 % (Amersham International plc, Little Chalfont, Buckinghamshire, England).
- ♦ **Tampone HEPES•ioni^{gl}** (privo di glucosio).
- ♦ **MnCl₂** (Merck).
- ♦ **TNF**.

* Gli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} , omissi durante l'intero processo di separazione dei PMN dal sangue, venivano aggiunti alle cellule immediatamente prima del loro utilizzo nel saggio; «congelando» fino all'ultimo la funzionalità integrinica (vedi INTRODUZIONE, capitolo 5) si preveniva infatti l'eventuale aggregazione dei neutrofili in sospensione, che avrebbe compromesso la fase sperimentale vera e propria.

- ♦ **KOH** al 10 % in acqua.
- ♦ **HCl** 1 N e 1.78 N in acqua.
- ♦ **Liquido di scintillazione** (ReadySafe™, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, U.S.A.).

METODO

In alternativa alla misura della produzione di O_2^- , l'attività metabolica dei PMN poteva essere valutata in termini di nmoli di glucosio ossidato durante il ciclo o *shunt* dei pentosi.

La popolazione cellulare, risospesa a 3×10^6 PMN/ml in tampone HEPES•ioni^{gl}, veniva preriscaldata per 10' a 37°C in agitazione; contemporaneamente si provvedeva a preriscaldare anche la piastra utilizzata per il saggio, i cui pozzetti, rivestiti con FN o LM, contenevano:

- D-[1-¹⁴C] glucosio (0.5 µCi);
- tampone HEPES•ioni^{gl} e, ove richiesto,
- TNF (c.f.: 10 ng/ml);
- MnCl₂ (c.f.: 1 mM),

per un volume totale di 600 µl.

Dopo avervi aggiunto 100 µl della sospensione cellulare, ciascun pozzetto veniva sigillato con un apposito tappo di gomma dotato di un pozzettino interno precedentemente riempito con 200 µl di KOH al 10 %; questa procedura aveva il duplice scopo di impedire la fuoriuscita della ¹⁴CO₂ prodotta in seguito alla metabolizzazione del glucosio da parte dei PMN e di catturare le molecole radioattive sotto forma di bicarbonato di potassio (KHCO₃). La piastra così allestita veniva quindi incubata a 37°C per 60', dopodichè l'attività metabolica veniva bloccata iniettando in ogni pozzetto, attraverso il tappo di gomma, 0.5 ml di HCl 1 N. Si riponeva infine la piastra a 4°C per tutta la notte, al fine di permettere una buona equilibratura del sistema.

Il giorno seguente, da ogni pozzettino contenente KOH venivano prelevati 150 µl e la radioattività ad essi associata veniva misurata trasferendoli in *vial* allestite con 150 µl di HCl 1.78 N (come neutralizzante) in 10 ml di liquido di scintillazione, che venivano sottoposte a lettura in un *β-counter* (LS6000TA, Beckman). Misurando la radioattività associata ad una quantità nota di D-[1-¹⁴C] glucosio si potevano quindi calcolare le nmoli di glucosio ossidato in ogni prova e riportarle infine a 10⁶ PMN.

II. Misura dell'adesione

MATERIALI

- ♦ **PBS.**
- ♦ **Tampone acetato** 20 mM pH 4.2, contenente **CTAB** (cetil trimetil ammonio bromuro, Eastman Kodak Co., Rochester N.Y., U.S.A.) 0.1 %.
- ♦ **TMB** (3,3',5,5'-tetrametil benzidina, Serva, Feinbiochemica, GmbH & Co., Heidelberg, Germania) 25 mM in DMSO (dimetilsulfossido, Merck).
- ♦ **AMT** (3-ammino-1,2,4-triazolo, Sigma) 100 mM in acqua distillata.
- ♦ **H₂O₂** 0.7 mM in acqua distillata.
- ♦ **H₂SO₄** 2 N in acqua distillata.

METODO

La quantità di cellule che avevano aderito al substrato durante il saggio metabolico si valutava in base al dosaggio dell'attività della mieloperossidasi (MPO), enzima assunto come marker dei neutrofilo.

Al termine del saggio di produzione di O₂⁻, i pozzetti venivano capovolti e immersi in una vaschetta contenente PBS a 37°C per favorire il distacco delle cellule non adese; dopo 5' essi venivano svuotati mediante aspirazione con una pompa a vuoto.

Alternativamente, per un lavaggio più vigoroso, i pozzetti venivano completamente riempiti con PBS, sigillati con appositi tappi, capovolti e centrifugati per 5' a 200 x g alla temperatura di 20°C. Dopo la centrifugazione i pozzetti venivano stappati e svuotati mantenendo la piastra sempre capovolta ed infine i residui di liquido venivano aspirati mediante l'utilizzo di una pompa a vuoto.

Il test enzimatico colorimetrico si effettuava aggiungendo ad ogni pozzetto 75 µl di tampone acetato contenente CTAB e additivato con TMB (c.f. 2mM) e AMT (c.f. 4 mM). Il CTAB è un detergente cationico che rompe le membrane cellulari, liberando così dai granuli la MPO che diventa accessibile al substrato. Il TMB è un composto fotosensibile che viene ossidato dalla MPO in presenza di H₂O₂. L'AMT è un inibitore selettivo della eosinofiloperossidasi che veniva introdotto nel saggio per evitare eventuali errori dovuti alla contaminazione delle sospensioni di PMN da parte di eosinofili. Infatti, essendo l'attività perossidasi degli eosinofili dieci volte superiore su base cellulare a quella dei PMN, una contaminazione anche bassa delle sospensioni cellulari da parte di eosinofili

potrebbe alterare i risultati portando ad una sovrastima dell'entità di adesione dei PMN, qualora gli eosinofili avessero una maggiore adesività dei neutrofilo [113].

La piastra veniva agitata per 5 minuti allo scopo di facilitare l'azione del detergente, dopodiché si aggiungevano a ciascun pozzetto 75 µl di H₂O₂ 0.7 mM per innescare la reazione di ossidazione del TMB da parte della MPO. Tale reazione veniva bloccata dopo alcuni secondi aggiungendo 100 µl di H₂SO₄ 2 N ad ogni pozzetto. Per determinare la quantità di TMB ossidato la piastra veniva letta alla lunghezza d'onda di 405 nm nel lettore per micropiastre. Il calcolo della percentuale di cellule adese veniva effettuato sulla base di una curva di taratura costruita, in ciascun esperimento, misurando l'attività perossidasi di quantità note di PMN.

5. Valutazione del grado di polimerizzazione del citoscheletro

MATERIALI

- ♦ *Piastre per colture cellulari* da 24 pozzetti (Nunc)
- ♦ *Vetrini coprioggetto* di 13 mm Ø.
- ♦ *NBD fallacidina* [N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) fallacidina] (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon, U.S.A.).
- ♦ *L-α-lisolecitina* (L-α-lisofosfatidilcolina) di tipo I da tuorlo d'uovo (Sigma).
- ♦ *Formaldeide* al 37 % (Merck).
- ♦ *Metanolo* assoluto (Merck).
- ♦ *p-fenilendiammina* (Sigma) 1 % in PBS.
- ♦ *Glicerolo* ('AnalaR', BDH Laboratory Supplies, Broom Rd Poole, England).

METODI

a) Quantizzazione dell'actina filamentosa (F-actina)

Il livello di polimerizzazione dell'apparato citoscheletrico si valutava in termini di quantità di F-actina totale contenuta nelle cellule.

I PMN (0.2 ml/pozzetto di una popolazione a 3 x 10⁶ cellule/ml, preriscaldata a 37°C per 10' in agitazione) venivano dispensati in pozzetti rivestiti con MT, FN o LM e contenenti, in un volume di 0.4 ml, tampone HEPES ioni e, ove richiesto, TNF (c.f.: 10 ng/ml) e MnCl₂ (c.f.: 1 mM). Le cellule venivano quindi incubate per 30' a 37°C e poi fissate aggiungendo formalina ai pozzetti (c.f.: 3.7 %). Dopo 15' a temperatura ambiente, il

contenuto dei pozzetti veniva aspirato tramite pompa a vuoto ed i pozzetti stessi venivano lavati per 3 volte con PBS. Le cellule venivano successivamente trattate per 15' a 37°C con una soluzione di L-lisolecitina (100 µg/ml) e NBD fallacidina (1.65×10^{-7} M) in PBS (0.2 ml/pozzetto); la L-lisolecitina agisce come permeabilizzante delle membrane cellulari e consente pertanto la penetrazione della NBD fallacidina, sonda fluorescente che si lega alla F-actina. Dopo ulteriori 3 lavaggi, si procedeva all'estrazione della NBD fallacidina associata al citoscheletro dispensando 0.7 ml di metanolo assoluto in ogni pozzetto; la piastra veniva mantenuta per 1h a 4°C, al buio, ed agitata più volte manualmente ad intervalli di tempo regolari. Da ciascun pozzetto si prelevavano quindi 0.6 ml, che venivano analizzati in un fluorimetro per micropiastre (FLUOstar, SLT Labinstruments GmbH, Grödig, Austria) alle lunghezze d'onda di 485 nm (eccitazione) e 538 nm (emissione). L'intensità di fluorescenza che si misurava, indicativa della quantità di F-actina marcata dalla sonda, veniva riportata proporzionalmente al volume complessivo di ciascun pozzetto (0.7 ml) ed infine la F-actina totale veniva espressa in unità di fluorescenza relative (UFR) $\times 10^6$ PMN.

b) Visualizzazione del citoscheletro in microscopia a fluorescenza

Vetrini coprioggetto di 13 mm \varnothing venivano collocati sul fondo dei pozzetti e rivestiti con FN o LM. In ogni pozzetto venivano quindi dispensati 0.1 ml della medesima popolazione cellulare utilizzata nelle prove di quantizzazione della F-actina e si procedeva esattamente come descritto per queste ultime, fino al termine dell'incubazione con la sonda fluorescente. A questo punto i vetrini, lavati con PBS, venivano recuperati dal fondo dei pozzetti e montati capovolti ciascuno su un vetrino portaoggetto, interponendo una goccia di soluzione di p-fenilendiammina 0.1 % (9 parti di glicerolo, 1 parte di p-fenilendiammina 1 %, pH 8.0) per rallentare il decadimento spontaneo della fluorescenza. I preparati venivano infine osservati al microscopio a fluorescenza e fotografati.

6. Allestimento dei preparati per l'osservazione al microscopio elettronico a scansione

MATERIALI

- ♦ ***Supporti di plastica Thermanox*** per colture cellulari di 13 mm \varnothing (Nunc).
- ♦ ***Piastre per colture cellulari*** da 24 pozzetti (Nunc).

- ♦ **Glutaraldeide** (Merck) 2 % in PBS.
- ♦ **Etanolo** (Merck) in soluzioni dal 30 % al 100 %.

METODO

I supporti di plastica venivano collocati sul fondo dei pozzetti e rivestiti con FN o LM. In ogni pozzetto, allestito in maniera del tutto analoga a quella descritta per i saggi funzionali, venivano quindi dispensati 0.2 ml di un popolazione cellulare a 3×10^6 PMN/ml, precedentemente riscaldata (o preincubata con i reagenti previsti) a 37°C per 10', in agitazione. Dopo 30' di incubazione della piastra a 37°C, le cellule non aderenti venivano rimosse aspirando delicatamente il medium e lavando due volte i supporti con PBS. Le cellule rimaste adese venivano fissate per 15' a temperatura ambiente con glutaraldeide 2% e si procedeva quindi alla disidratazione dei campioni mediante trattamento sequenziale con etanolo a concentrazioni crescenti (30-50-70-90-100 %). Ciascun passaggio in etanolo, della durata di 10', veniva ripetuto 3 volte. Infine i campioni, mantenuti in etanolo al 100 %, venivano processati secondo le tecniche convenzionali utilizzate per l'osservazione con il microscopio elettronico a scansione. Queste ultime fasi, come pure le immagini fotografiche dei preparati, sono state effettuate dal sig. T. Ubaldini, presso il Centro Servizi Polivalenti di Ateneo-Sezione Grandi Strumenti Scientifici, Università di Trieste.

7. Valutazione dell'espressione delle integrine

MATERIALI

- ♦ **Anticorpi monoclonali** di topo e di ratto, diretti contro le catene integriniche α e β (vedi Tab. II a pag. 20).
- ♦ **Frammento $F(ab')_2$ fluoresceinato** (FITC) di anticorpo di coniglio, diretto contro le IgG di topo (Sigma).
- ♦ **Frammento $F(ab')_2$ fluoresceinato** (FITC) di anticorpo di capra, diretto contro le IgG di ratto (Sigma).
- ♦ **Formaldeide** (Merck) 2 % in PBS.

METODO

L'espressione delle diverse integrine sulla superficie dei PMN si valutava misurando il legame dei mAb specifici alle cellule.

La popolazione cellulare, risospesa a 1.5×10^6 PMN/ml in tampone HEPES•ioni o HEPES•EDTA, veniva portata a 37°C ed incubata o meno con TNF (c.f.: 10 ng/ml) per 20', in agitazione, alla stessa temperatura. Subito dopo le provette venivano messe in ghiaccio per 15' e l'intera procedura successiva si eseguiva a 0°-4°C per evitare l'internalizzazione delle molecole di membrana una volta avvenuto il legame con gli anticorpi. Le sospensioni cellulari, suddivise in provette tipo *Eppendorf* (450.000 PMN/provetta), venivano incubate per 45' con i diversi mAb anti integrina alla concentrazione di 2-4 µg/ml. Allo scopo di rimuovere l'eccesso di anticorpo non legato, le cellule venivano poi lavate per due volte aggiungendo 1-1.5 ml di PBS freddo ad ogni provetta e centrifugando per 10'' a 12.000 x g. I *pellet* venivano quindi risospesi in 0.25 ml di PBS contenenti il frammento F(ab')₂ fluoresceinato, alla concentrazione di 2 µg/ml. Dopo 30' di incubazione e due ulteriori lavaggi con PBS freddo, i PMN venivano fissati risospendendo ciascun *pellet* in 0.5 ml di formalina al 2 %. Le sospensioni cellulari venivano infine analizzate mediante un citofluorimetro a flusso (EPICS-C, Coulter corp., Hialeah, Florida, U.S.A.).

L'immunofluorescenza aspecifica veniva valutata misurando il legame del F(ab')₂ fluoresceinato a PMN che non erano stati precedentemente incubati con mAb.

Le misure della fluorescenza associata alle cellule sono state effettuate presso il laboratorio dell'Ospedale di Cattinara di Trieste, dal dott. T. Zacchi.

8. Produzione e purificazione di anticorpi monoclonali

MATERIALI

♦ **Linee cellulari:** *TS1-18*; *TS1-22*; *MY/904*; *BB7.5* (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, U.S.A.).

♦ **Media per colture cellulari*:**

a) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contenente L-glutammina 2 mM e glucosio 4.5 g/L (HyClone Laboratories, Inc., Utah, U.S.A.), addizionato con:

* Il medium a) veniva utilizzato per gli ibridomi *TS1-18*, *TS1-22* e *MY/904* ; il medium b) per *BB7.5*.

- piruvato di sodio (Merck) 1mM;
- penicillina (100 U/ml)/streptomicina (100 µg/ml) (HyClone);
- siero fetale bovino (FBS) (HyClone) al 10 %.

b) RPMI 1640 HEPES (Irvine Scientific, Santa Ana, California, U.S.A.) contenente:

- L-glutamina 2 mM;
- penicillina (100 U/ml)/streptomicina (100 µg/ml) (HyClone);
- ipoxantina (Sigma) 10^{-4} M;
- timidina (BDH Biochemicals Ltd., Poole, England) 1.6×10^{-5} M;
- FBS (HyClone) al 10 %.

- ♦ **Flask per colture cellulari** da 25 cm² e 75 cm² (Costar).
- ♦ **Membrane da dialisi** con *cut-off* di 12.400 Dalton (Cellulose Membrane, Sigma).
- ♦ **Mab Trap[®] G II** (Pharmacia Biotech), *kit* per cromatografia d'affinità.

METODO

Le linee cellulari, conservate in azoto liquido, venivano scongelate e fatte crescere per alcuni giorni nei terreni liquidi sopra descritti. Allo scopo di ottenere maggiori quantità di anticorpo, un numero adeguato di cellule produttrici (5×10^6) veniva iniettato nel peritoneo di topi *Balb-c* precedentemente trattati con pristano, una sostanza irritante che li rende più reattivi al successivo inoculo della sospensione cellulare. In 3-4 settimane i topi sviluppavano un'ascite ricca di anticorpi; gli animali venivano allora sacrificati ed il liquido ascitico da essi prelevato veniva centrifugato a 3.000 x g e filtrato per eliminare eventuali coaguli e materiale lipidico in sospensione.

Dopo aver diluito il campione 1:1 in PBS, esso veniva sottoposto a cromatografia d'affinità utilizzando una colonna con proteina G immobilizzata (*Mab Trap[®] G II*); poiché la proteina G lega ad alta affinità la frazione Fc degli anticorpi, i mAb venivano trattenuti rispetto a tutte le altre proteine presenti nel liquido ascitico e venivano recuperati in un secondo momento, pressochè puri, adoperando il tampone di eluizione fornito dal *kit*. La soluzione contenente i mAb veniva quindi dializzata contro PBS per tutta la notte ed il grado di purezza ed integrità dei preparati veniva successivamente controllato mediante elettroforesi in gel denaturante di poliacrilamide (SDS-PAGE), in condizioni riducenti e non riducenti. Infine, la concentrazione anticorpale veniva determinata spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 280 nm, tenendo presente che a questa λ 1 mg/ml di anticorpo ha un'assorbanza pari a 1.2 unità.

9. Preparazione di frammenti F(ab')₂ da anticorpi monoclonali interi

MATERIALI

- ♦ *mAb* (vedi *Tab. II* a pag.).
- ♦ *ImmunoPure*[®] *F(ab')₂ Preparation Kit* (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.), comprendente:
 - pepsina immobilizzata su gel di agarosio;
 - colonna cromatografica con proteina A immobilizzata (*Protein A AffinityPak*[™] *Column*);
 - tamponi di *binding* e di eluizione.
- ♦ *Ficina* dal lattice di *Ficus glabrata*, immobilizzata su sferule di agarosio (Sigma).
- ♦ *Tamponi di digestione:*
 - A) Sodio acetato 20 mM, pH 4.5.
 - B) Tris 50 mM, pH 7.0, contenente EDTA 2 mM;
- ♦ *L-cisteina* (Sigma) 10 mM in tampone di digestione B.
- ♦ *Tubi da dialisi:* membrane di cellulosa con *cut-off* di 12.000 Dalton (Sigma).

METODI

a) Digestione con pepsina

I frammenti F(ab')₂ del mAb *M1/70* sono stati ottenuti mediante digestione dell'anticorpo intero con pepsina immobilizzata su gel di agarosio.

L'anticorpo, dializzato contro il tampone di digestione A e portato alla concentrazione di 10 mg/ml, veniva aggiunto in rapporto volumetrico 1:1 al gel con pepsina precedentemente risospeso nello stesso tampone. La provetta (tipo *Eppendorf*) contenente la miscela di reazione veniva quindi incubata a 37°C in agitazione per 18h, tempo scelto come ottimale in base ad una cinetica di digestione condotta preliminarmente. Al termine dell'incubazione l'attività della pepsina veniva bloccata diluendo la miscela 1:1 con il tampone di *binding* incluso nel *kit ImmunoPure*[®]. L'enzima veniva infine eliminato dal sistema centrifugando la provetta per 10'' a 12.000 x g; il gel di agarosio cui è legata la pepsina sedimentava infatti sul fondo ed era pertanto possibile recuperare il surnatante contenente i soli prodotti della digestione.

Per verificare la qualità della digestione una piccola aliquota del campione (pari a 5 µg/ml teorici) veniva sottoposta a SDS-PAGE; il resto si faceva passare attraverso una colonna d'affinità con proteina A immobilizzata (*kit ImmunoPure*[®]); poiché la proteina A (estratta dalla parete batterica di *Staphylococcus aureus*) lega la porzione Fc delle immunoglobuline di mammifero, i residui di mAb non digerito ed i frammenti Fc di

maggiori dimensioni venivano trattenuti in colonna, mentre i frammenti $F(ab')_2$ e gli eventuali Fab si raccoglievano nella prima frazione uscente. Tale frazione veniva quindi dializzata per tutta la notte contro PBS e la concentrazione anticorpale si determinava spettrofotometricamente sapendo che, alla lunghezza d'onda di 280 nm, 1 mg/ml di $F(ab')_2$ ha un'assorbanza di 1.48 unità.

Il grado di purezza della preparazione veniva controllato in SDS-PAGE, mentre la capacità dei $F(ab')_2$ di legarsi all'integrina specifica si valutava mediante tecniche citofluorimetriche (vedi capitolo 7).

b) Digestione con ficina

I frammenti $F(ab')_2$ dei mAb *TS1-18*, *TS1-22*, *3.9*, *MY/904* e *BB7.5* sono stati prodotti mediante digestione degli anticorpi interi con ficina, un enzima specifico per la sottoclasse IgG1 di topo il cui utilizzo presenta notevoli vantaggi:

- la digestione è rapida e stabile;
- il tempo necessario ad una digestione ottimale è comparabile per i diversi mAb;
- la resa è alta (45-60 %) e, soprattutto,
- l'immunoreattività dei $F(ab)_2$ è altamente conservata [114].

Le sferule rivestite con ficina venivano risposese nel tampone di digestione *B* alla concentrazione di 1.8 U di enzima/ml; la sospensione veniva quindi aggiunta ai mAb precedentemente dializzati contro il medesimo tampone, in modo tale che il rapporto in peso tra enzima e substrato fosse 13:30. Dopo l'aggiunta di cisteina (c.f.: 1 mM), che fornisce il gruppo sulfidrilico libero necessario all'attivazione della ficina, la provetta contenente la miscela di reazione veniva incubata a 37°C, in agitazione, per 6h (tempo risultato ottimale in base ad una cinetica di digestione effettuata in via preliminare). La reazione enzimatica veniva poi bloccata ponendo la provetta in ghiaccio, la ficina legata al gel veniva fatta sedimentare tramite centrifugazione di 10'' a 12.000 x g per poter quindi recuperare un surnatante contenente i soli prodotti della digestione. Tutti i passaggi successivi erano uguali a quelli descritti in *Digestione con pepsina*.

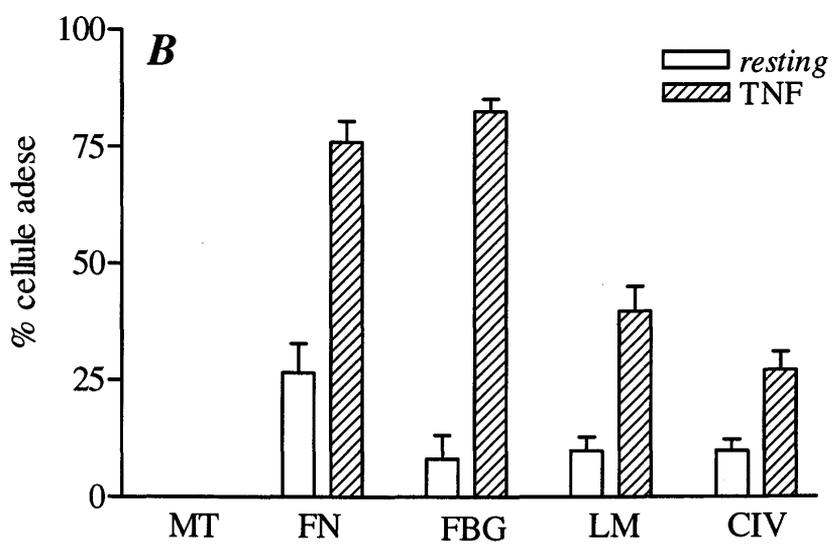
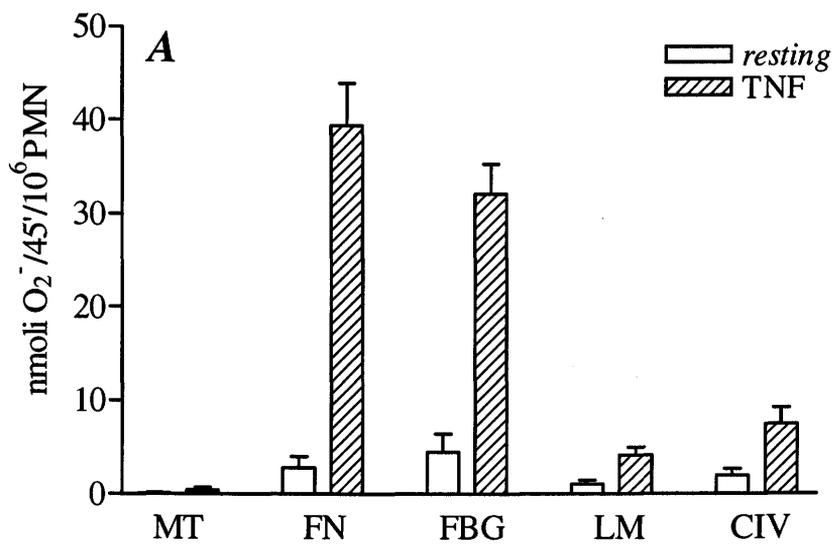
RISULTATI E DISCUSSIONE

1. Attivazione metabolica dei PMN indotta dal TNF: dipendenza dall'adesione

I neutrofili umani sono in grado di rispondere al TNF con una consistente e sostenuta produzione di O_2^- (*burst* respiratorio) solo se posti in condizione di aderire ad un substrato in fase fissa [98, 115, ,116]. E' inoltre accertato che la loro attività metabolica viene modulata in modo differente a seconda della superficie con cui prendono contatto e con la quale instaurano peculiari interazioni adesive [85, 97, 117]. Ciò emerge chiaramente dai grafici della *Figura 1* che riassumono i risultati di esperimenti preliminari condotti allo scopo di valutare se, e in quale misura, la capacità di risposta ossidativa e adesiva dei PMN al TNF dipenda dal substrato utilizzato, ovvero dal tipo di proteina della MEC scelta per il rivestimento delle superfici; l'analisi dei dati presentati permette di confermare che:

1. il TNF non è stimolo *per se* sufficiente ad innescare una risposta ossidativa da parte dei PMN, o, per lo meno, una risposta misurabile con il sistema di rilevamento da noi utilizzato; infatti, qualora le cellule vengano incubate con TNF su un substrato anti adesivo (MT), riproducendo così la condizione «in sospensione», non si evidenzia alcuna significativa produzione di O_2^- (*Fig. 1A*).
2. l'adesione dei PMN al substrato costituisce invece, già in condizioni basali, un fattore che predispone queste cellule all'attività metabolica, poiché su ognuna delle proteine di matrice considerate la produzione di O_2^- in condizioni di riposo (*resting*), anche ove limitatissima, non è mai trascurabile (*Fig. 1A*).
3. il TNF diventa stimolo respiratorio per i PMN proprio nel momento in cui favorisce l'interazione delle cellule con le diverse superfici. Dopo trattamento con TNF si registra sempre un incremento di adesione (*Fig. 1B*), qualsiasi sia la proteina di matrice sottesa, accompagnato da un'aumentata produzione di O_2^- . Bisogna tuttavia sottolineare che l'incremento del numero di cellule adese e quello dell'attività respiratoria non sono necessariamente proporzionali tra loro: sulla FN, per esempio, l'adesione in presenza di TNF risulta grossomodo triplicata, mentre la risposta metabolica aumenta più di dieci volte; sul FBG invece il TNF stimola più l'adesione che la risposta metabolica.

Figura 1. Risposta metabolica al TNF da parte di PMN in sospensione e a contatto con proteine della matrice extracellulare. **A)** In ciascun pozzetto, rivestito con MT o con proteine della MEC e contenente citocromo c (c.f.:12 mM) e, ove richiesto, TNF (c.f.: 10 ng/ml) in 100 μ l di HEPES•ioni, venivano aggiunti 50 μ l di una sospensione cellulare (1.5×10^6 PMN/ml in HEPES•ioni) preriscaldata per 10' a 37°C, in agitazione. La piastra veniva quindi incubata a 37°C per 45' ed il metabolismo ossidativo dei PMN, misurato in nmoli di O_2^- prodotte, si valutava mediante letture spettrofotometriche del citocromo c ridotto, come descritto in dettaglio nella sezione «MATERIALI E METODI» (capitolo 4, Ia). **B)** Al termine dell'incubazione, ovvero dopo l'ultima lettura spettrofotometrica, le cellule utilizzate nei saggi metabolici venivano sottoposte al *test* di adesione: i PMN che non avevano aderito al substrato venivano lavati via capovolgendo la piastra ed immergendola per 5' in PBS a 37°C; si procedeva quindi al dosaggio enzimatico colorimetrico descritto in «MATERIALI E METODI», cap. 4, II. Sia nel grafico A che nel B, i dati rappresentati sono le medie \pm errore standard (ES) dei risultati ottenuti da 7 esperimenti condotti in duplicato.



4. i PMN stimolati con TNF, molto più di quelli in condizioni *resting*, si comportano in modo quantitativamente e qualitativamente diverso a seconda della superficie con cui interagiscono; in altre parole, se appare quasi scontato che una proteina della MEC possa essere più o meno proadesiva di un'altra, non è affatto scontata la correlazione tra percentuale di cellule adese e conseguente risposta metabolica. Si può infatti notare che la LM favorisce l'adesione dei PMN stimolati con TNF più del CIV, mentre accade esattamente il contrario per quanto riguarda la produzione di O_2^- ; ancora, a parità di adesione, le cellule poste su FN rispondono più di quelle a contatto con FBG.

Tutte queste osservazioni suggeriscono che l'adesione è condizione necessaria ma non sempre sufficiente per il *burst* respiratorio indotto dal TNF. Ciò che conta ai fini di una consistente produzione di O_2^- sembra essere infatti la qualità del rapporto che si instaura tra neutrofilo e substrato, più che il numero complessivo di cellule aderenti.

Per studiare i meccanismi sottesi a tale evidenza si è deciso di circoscrivere l'attenzione a due tipi di superficie che sono, in maniera diversa, rappresentativi del rapporto quantità/qualità di adesione: la FN e la LM.

La FN è la proteina di matrice sulla quale, nelle nostre mani, i PMN rispondono maggiormente al TNF sia in termini di adesione che di *burst* respiratorio ed è quindi la superficie che meglio ci consente di indagare quali siano i requisiti adesivi per una massiccia produzione di O_2^- .

La LM, d'altro canto, rappresenta il substrato su cui si nota la più accentuata discrepanza tra numero di cellule adese e risposta metabolica al TNF: risulta infatti discretamente proadesiva, ma scarsamente o per nulla permissiva ai fini del *burst*; offre quindi il prototipo di un'adesione che, seppure consistente, non possiede le caratteristiche indispensabili per mediare l'attivazione metabolica.

2. Caratterizzazione dell'adesione dei PMN a LM ed a FN

a) Valutazione della forza di ancoraggio delle cellule al substrato

La diversa attitudine metabolica che i PMN stimolati con TNF dimostrano su LM e FN dev'essere in qualche modo dipendente da una differente qualità di adesione alle due superfici. Ipotizzando che il fattore determinante sia la tenacia dell'interazione cellula-proteina di matrice, si è pensato di poter mettere in evidenza una forza di ancoraggio differenziale sottoponendo i PMN incubati su LM o FN a due diversi tipi di lavaggio, prima di procedere alla quantizzazione delle cellule adese.

Nella *Tabella III* sono riassunti i risultati ottenuti eliminando i PMN non aderenti con il semplice capovolgimento della piastra (lavaggio a 1 x g) o mediante centrifugazione a 200 x g della piastra capovolta. L'unica condizione sperimentale in cui si può mettere in evidenza un'adesione meno tenace è quella rappresentata dai PMN *resting* su LM; infatti, solo in questo caso il numero di cellule rimaste adese dopo centrifugazione è inferiore a quello delle cellule non centrifugate. Dobbiamo concludere quindi che, mentre le cellule a riposo aderiscono alla FN più tenacemente che alla LM, sotto effetto del TNF i PMN aderiscono alle due proteine con pari tenacia; pertanto è probabile che la forza di adesione al substrato non debba essere messa in relazione con la risposta metabolica al TNF.

b) Morfologia dei PMN stimolati con TNF su LM e su FN

L'osservazione delle cellule al microscopio ottico rovesciato ci aveva permesso di individuare una differenza morfologica tra i PMN a contatto con LM e quelli adesi a FN, rilevabile già in condizioni *resting* ma decisamente più accentuata dopo trattamento con TNF.

Al microscopio elettronico a scansione si può osservare (*Fig. 2*) che il tipo di proteina della matrice condiziona la morfologia dei PMN a riposo. Infatti, sebbene su entrambi i substrati la maggiorparte delle cellule assuma un aspetto tondeggiate, sulla FN (*Fig. 2b*) compaiono anche morfologie di tipo *spread*: i neutrofili sono cioè appiattiti sul substrato, al punto da far sembrare il citoplasma quasi un velo da cui sporge il nucleo. A forte ingrandimento (*Fig. 2b, inserto*) si è inoltre in grado di apprezzare una certa differenza anche tra PMN tondeggianti: le cellule sulla FN sono sempre caratterizzate da un lembo di citoplasma appiattito al substrato, non individuabile invece nei PMN su LM (*Fig. 2a, inserto*).

Le diversità morfologiche appaiono esaltate in presenza di TNF: sulla LM le cellule sono allungate, con pseudopodi anche lunghissimi, ed assumono un aspetto di «cellula migrante» (*Fig. 2c*); sulla FN, invece, viene portata al massimo grado quella tendenza allo *spreading* già riconoscibile in assenza di TNF: l'immagine a piccolo ingrandimento (*Fig. 2d*) rivela come nel neutrofilo *spread* la superficie di contatto con il substrato sia enormemente aumentata.

In base a queste osservazioni morfologiche si può ritenere verosimile che esista una relazione tra il *burst* metabolico indotto da TNF su FN e lo *spreading* osservabile su questa proteina in risposta al TNF stesso.

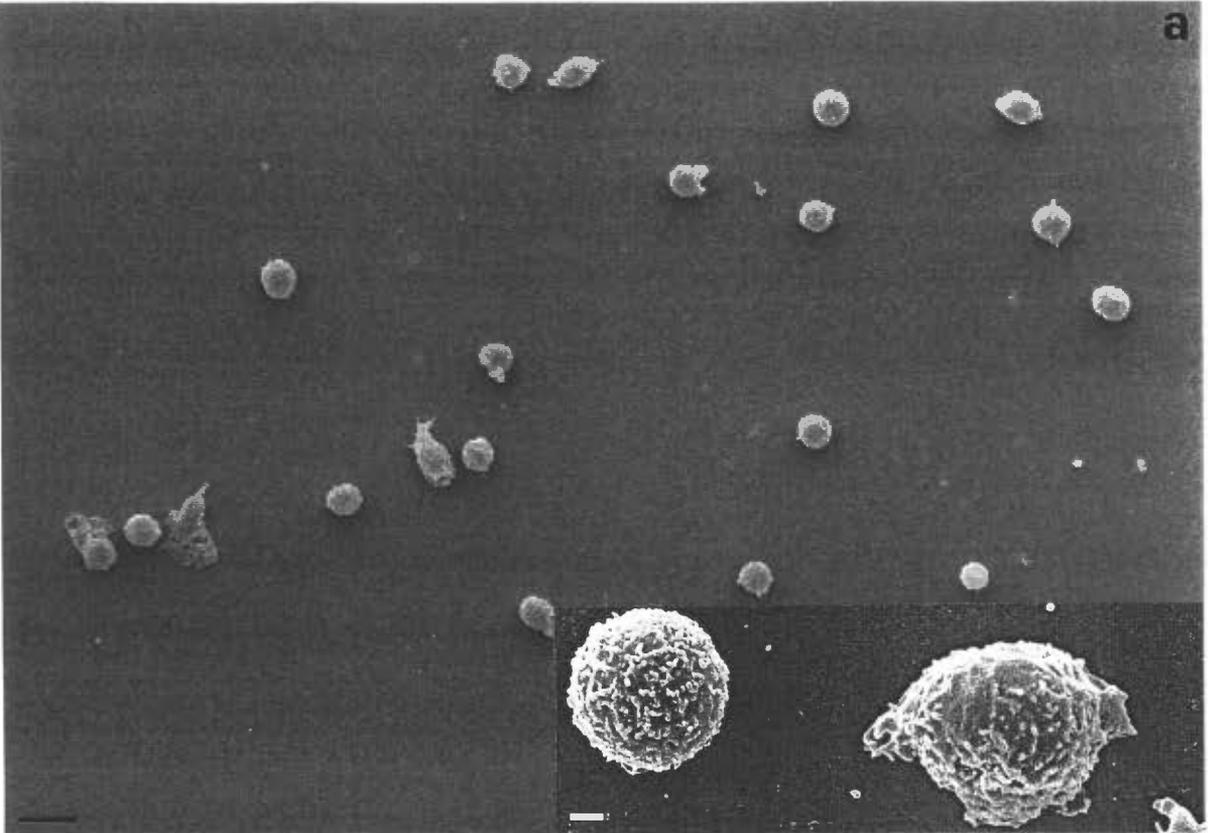
Tabella III. Effetto della forza centrifuga sulla valutazione dell'adesione di PMN a riposo e stimolati con TNF

superficie	condizioni	% adesione (lavaggio a 1 x g)	% adesione (lavaggio a 200 x g)
Laminina	<i>resting</i>	18.1 ± 4.5	6.3 ± 2.0
	+ TNF	55.4 ± 5.8	49.3 ± 1.8
Fibronectina	<i>resting</i>	51.2 ± 7.8	45.9 ± 10.5
	+ TNF	86.4 ± 7.4	88.8 ± 5.7

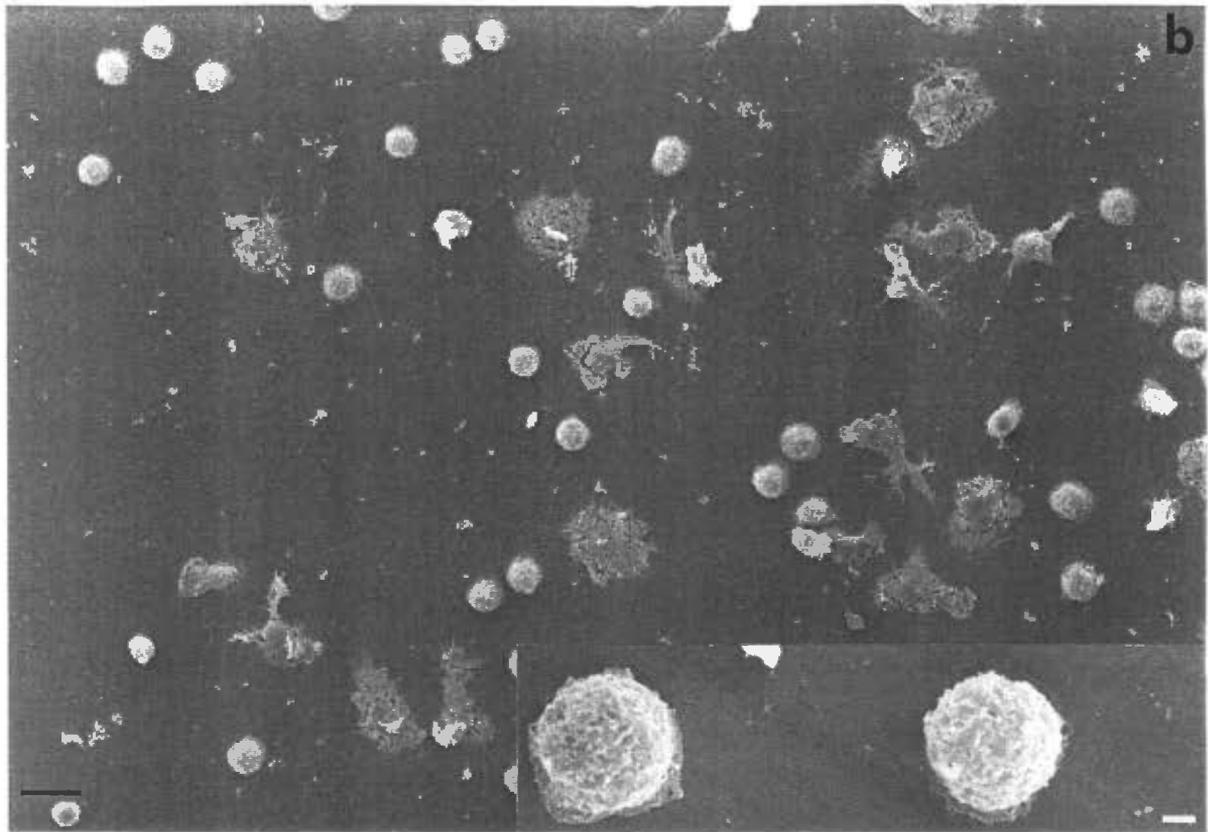
75 x 10³ PMN/prova venivano incubati per 45' a 37°C con o senza TNF (c.f.: 10 ng/ml), in pozzetti rivestiti con LM o FN e portati ad un volume finale di 150 µl con tampone HEPES•ioni. Al termine dell'incubazione i PMN venivano sottoposti alternativamente a due tipi di lavaggi: uno più delicato (5' di immersione della piastra capovolta in PBS a 37°C), l'altro più vigoroso (5' di centrifugazione dei pozzetti a 200 x g e a 20°C, dopo averli riempiti con PBS, tappati e capovolti). Si quantizzavano infine le cellule rimaste adese mediante *test* enzimatico colorimetrico (MATERIALI E METODI, cap. 4, II). I dati rappresentano le medie ± ES dei risultati di 3 esperimenti condotti in duplicato.

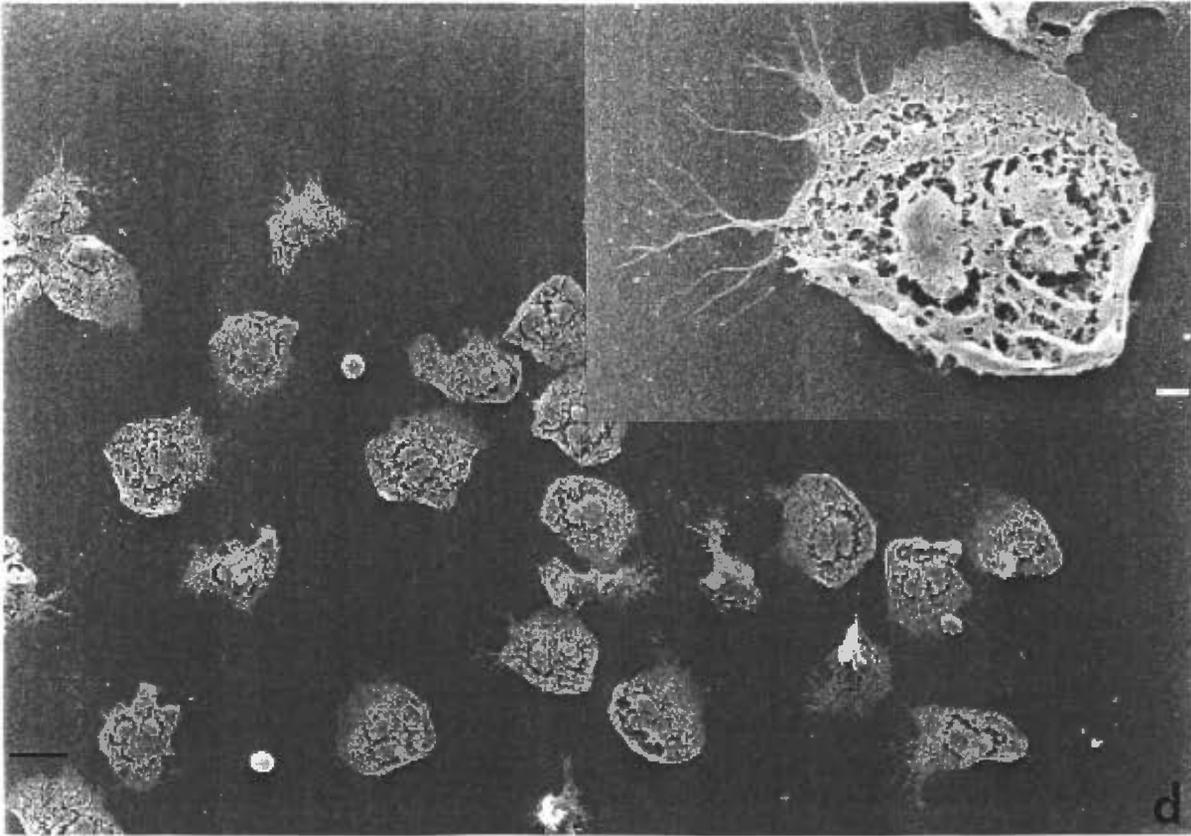
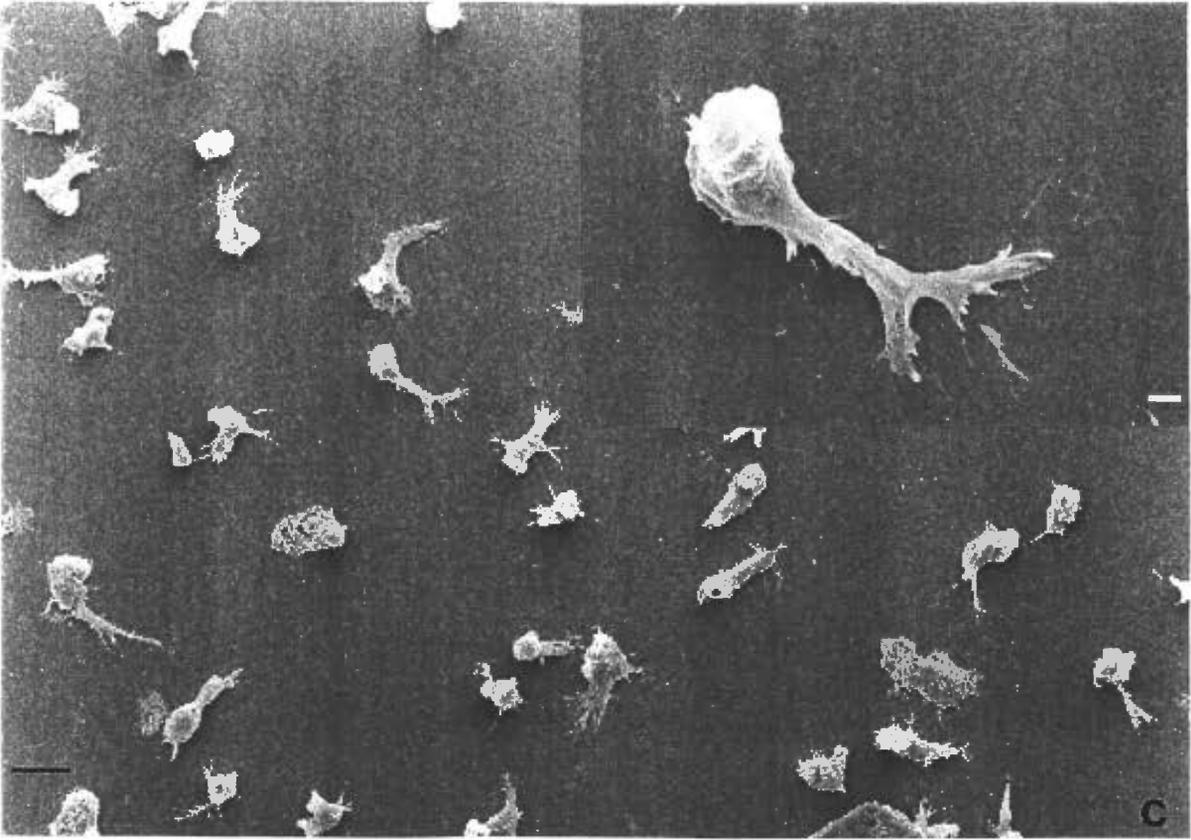
Figura 2. Immagini al microscopio elettronico a scansione di PMN resting e stimolati con TNF su LM e FN. Le cellule (0.2 ml/prova di una popolazione a 3×10^6 PMN in HEPES•ioni) venivano incubate per 30' a 37°C, con o senza TNF 10 ng/ml, su supporti di plastica precedentemente rivestiti con FN o LM e depositati sul fondo di pozzetti di piastre per coltura (volume finale: 0.6 ml di HEPES•ioni). Al termine dell'incubazione i pozzetti venivano lavati due volte con PBS e le cellule rimaste adese venivano quindi fissate con glutaraldeide 2%. I preparati venivano infine allestiti per l'osservazione al microscopio elettronico a scansione come descritto in «MATERIALI E METODI», cap. 6. **Pannello I:** PMN *resting* su LM (*a*) e su FN (*b*) (barre = 10 μ m; barre nei riquadri = 2 μ m). **Pannello II:** PMN stimolati con TNF su LM (*c*) e su FN (*d*) (barre = 10 μ m; barre nei riquadri = 2 μ m).

a



b





3. Inibizione dello *spreading* su FN ed induzione dello *spreading* su LM: effetti sul metabolismo ossidativo

In letteratura esistono varie voci sull'associazione tra *spreading* dei neutrofilo e *burst* respiratorio [85, 91, 94, 95, 97]. Sebbene sia azzardato sostenere una relazione di causalità diretta tra i due fenomeni, emerge tuttavia il concetto che, effettivamente, per un'intensa produzione di O_2^- il PMN debba instaurare con il substrato un contatto particolarmente stretto. Quali siano i meccanismi alla base dello *spreading* ed in quale modo questo fenomeno morfologico si connetta con il *burst*, sono aspetti indagati, in parte noti, ma non ancora esaurientemente chiariti.

a) Inibizione dello *spreading* su FN

Tornando a quanto si osserva nelle nostre condizioni sperimentali, si può ipotizzare che la FN risulti permissiva al *burst* metabolico indotto da TNF in quanto consente ai PMN attivati un'adesione di tipo *spread*. E' inoltre intuibile, e comunque sostenuto da dati di letteratura, che lo *spreading* implichi un consistente riarrangiamento citoscheletrico, in cui intervengono fasi di polimerizzazione e depolimerizzazione dell'actina. Bloccare questo rimodellamento cellulare significa impedire che il neutrofilo acquisisca la morfologia *spread*, compromettendo pertanto l'innescò del *burst* [85]. Abbiamo potuto verificarlo noi stessi utilizzando la citocalasina B (CB) o la genisteina; la CB è un metabolita fungino capace di disgregare i filamenti di actina polimerizzata [85], mentre la genisteina è un inibitore delle tirosin-chinasi coinvolte nella formazione delle adesioni focali che caratterizzano lo *spreading* [118].

Come si vede nella *Tabella IV*, la presenza della CB o della genisteina nel mezzo di incubazione dei PMN ha un drastico effetto inibitorio sulla stimolazione da TNF: la produzione di O_2^- risulta pressochè annullata a dispetto di una percentuale di adesione non significativamente diminuita. L'osservazione dei PMN al microscopio ottico rivela però quanto profondamente la CB e la genisteina, attraverso meccanismi diversi, abbiano interferito con la morfologia delle cellule aderenti: esse non sono più *spread*, bensì tondeggianti, seppure non esattamente comparabili con le classiche cellule *resting*. Queste evidenze rappresentano un'ulteriore conferma del fatto che, a parità di cellule adese, ciò che conta ai fini del *burst* è la qualità dell'interazione PMN-substrato.

b) Induzione dello *spreading* su LM

Avendo verificato direttamente l'importanza dello *spreading* nell'attivazione del metabolismo ossidativo indotto da TNF su FN, si è rafforzata in noi l'idea che l'assenza di

Tabella IV. Effetto della genisteina e della citocalasina B (CB) sulla produzione di O₂⁻ e sull'adesione a FN di PMN stimolati con TNF.

condizioni	nmoli O ₂ ⁻ /45'/10 ⁶ PMN	% cellule adese
controllo	26.6 ± 4.5	61.2 ± 5.0
+ genisteina	1.1 ± 0.6	56.3 ± 8.5
+ CB	2.8 ± 0.5	56.0 ± 6.0

Le cellule (1.5 x 10⁶ PMN/ml in HEPES•ioni) venivano preincubate per 10' a 37°C, in sospensione, con genisteina 50 µM o CB a 5 µg/ml; la popolazione di controllo veniva preriscaldata per 10' a 37°C in tampone HEPES•ioni privo di inibitori. Dopo il trattamento in sospensione i PMN (50 µl/prova) venivano dispensati in pozzetti rivestiti con FN, contenenti citocromo c (c.f.: 12 mM), TNF (c.f.: 10 ng/ml) e, nelle prove che lo richiedevano, genisteina o CB in quantità tali da mantenerne costante la concentrazione. La piastra veniva quindi incubata a 37°C per 45', durante i quali si valutava la produzione di O₂⁻ come descritto in MATERIALI E METODI, cap. 4, Ia. Al termine del saggio metabolico le stesse cellule, lavate con PBS tramite centrifugazione di 5' a 200 x g, venivano sottoposte al *test* di adesione (MATERIALI E METODI, cap. 4, II). I dati sono le medie ± ES dei risultati ottenuti in 3 esperimenti condotti in duplicato.

burst su LM fosse legata all'incapacità dei PMN stimolati con TNF di acquisire la morfologia *spread* su questo tipo di superficie. Ci si è chiesti allora se, inducendo in qualche modo un'adesione più intima delle cellule alla LM, avremmo potuto provocare un aumento significativo della produzione di O_2^- in risposta al TNF.

Notoriamente, le molecole di adesione coinvolte nel dialogo cellula-MEC sono le integrine; se ci riferiamo in particolare alle interazioni recettoriali dei PMN con FN e LM, esse sono riconducibili essenzialmente ad integrine del tipo β_1 e β_2 [91, 97, 98, 119, 120]. Nell'ipotesi che in condizioni normali sulla LM si verificasse un incompleto reclutamento delle integrine espresse dai PMN, abbiamo pensato che, provocandone artificialmente l'attivazione massimale, si potesse ottenere quello *shift* morfologico altrimenti assente. Poiché è stata documentata la capacità di cationi divalenti quali il Mn^{2+} di attivare in maniera aspecifica proprio le suddette famiglie integriniche [58-60], abbiamo cercato di indurre *spreading* su LM aggiungendo $MnCl_2$ al mezzo di incubazione dei PMN.

Nella *Figura 3* è riportata la curva dose-risposta al Mn^{2+} , in base alla quale è stata scelta la concentrazione pari a 1 mM per tutti gli esperimenti successivi. Sia in condizioni *resting* che di stimolazione con TNF il Mn^{2+} 1 mM induce infatti il maggiore incremento di adesione ad entrambe le superfici (LM e FN), segno di una ottimale attivazione delle integrine coinvolte.

Si riportano inoltre nella *Figura 4* i dati ottenuti da esperimenti di adesione in presenza di Mn^{2+} 1 mM, dai quali emerge non solo l'effettiva capacità del catione di stimolare in maniera significativa l'adesione basale e stimolata sia su LM che su FN, ma anche il «livellamento» ottenuto in sua presenza: il numero di cellule adese a LM e FN è infatti grossomodo equivalente tanto per i PMN *resting* che per quelli stimolati con TNF.

Ma qual è l'assetto morfologico di queste cellule, forzate all'adesione? La microscopia a scansione ci fornisce ancora una volta dettagliate informazioni; le fotografie raccolte nella *Figura 5* (da confrontare con quelle della *Fig. 2*) permettono di evidenziare che:

- I. il Mn^{2+} altera la morfologia dei PMN in ognuna delle condizioni considerate, esaltando lo stiramento e/o l'appiattimento delle cellule al substrato;
- II. se sulla FN il fenomeno appare meno evidente in quanto i PMN vanno comunque incontro a *spreading* in presenza di TNF, sulla LM l'effetto del Mn^{2+} è eclatante. Compagnano infatti frequenti cellule *spread* (*Fig. 4c*) e nei PMN che mantengono una

Figura 3. Dose-risposta al Mn^{2+} in PMN a riposo e stimolati con TNF su FN e LM. I PMN (75×10^3 cellule/prova) venivano incubati a $37^\circ C$ in pozzetti rivestiti con FN o LM, contenenti o meno TNF (c.f.: 10 ng/ml) e $MnCl_2$ alle concentrazioni indicate, in 150 μl totali di HEPES•ioni. Dopo 45' di incubazione e lavaggio dei pozzetti a 200 x g, si valutava la percentuale di PMN rimasti adesi come descritto in MATERIALI E METODI, cap. 4, II. Le curve rappresentano i risultati di un esperimento condotto in duplicato.

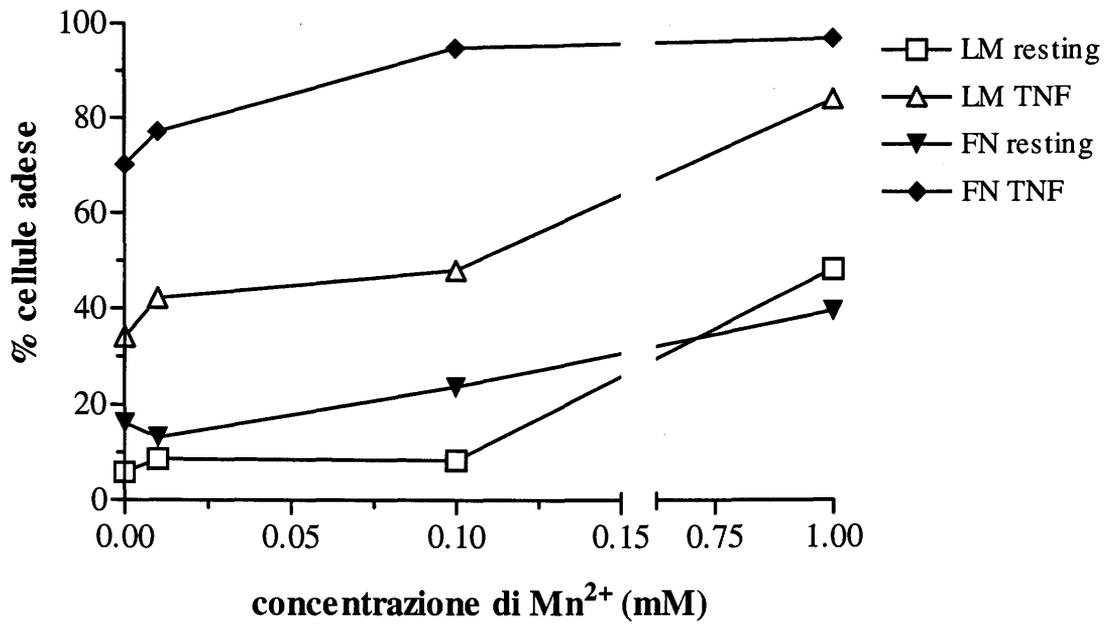


Figura 4. Effetto del Mn^{2+} 1 mM sull'adesione a LM e FN di PMN resting e stimolati con TNF.

Le condizioni sperimentali erano uguali a quelle relative alla Fig. 3, ad eccezione del fatto che il $MnCl_2$ era qui usato ad una sola concentrazione (1 mM finale). Sono espresse graficamente le medie \pm ES dei risultati di 5 esperimenti condotti in duplicato. L'analisi statistica dei dati si basa sul *test* t di Student ed è stata effettuata su dati non appaiati (due code). I livelli di significatività, relativi al confronto tra prove senza (controllo) e con Mn^{2+} , sono espressi con i seguenti simboli: * = significativo ($p < 0.05$); ** = significativo ($p < 0.01$).

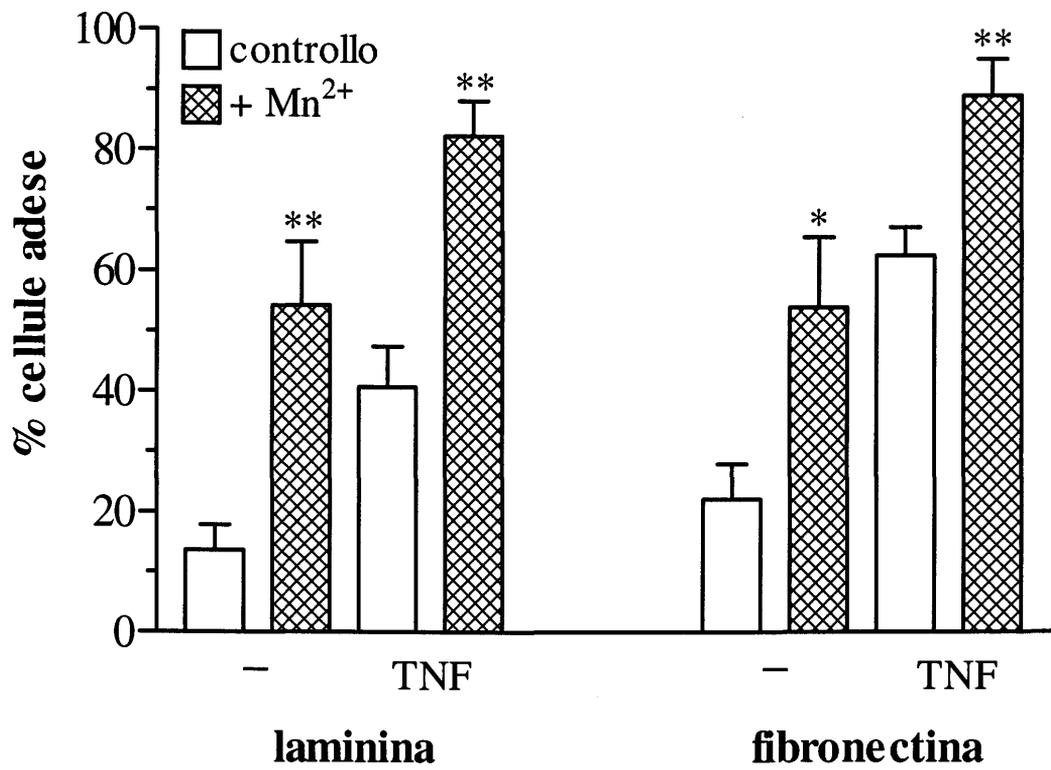
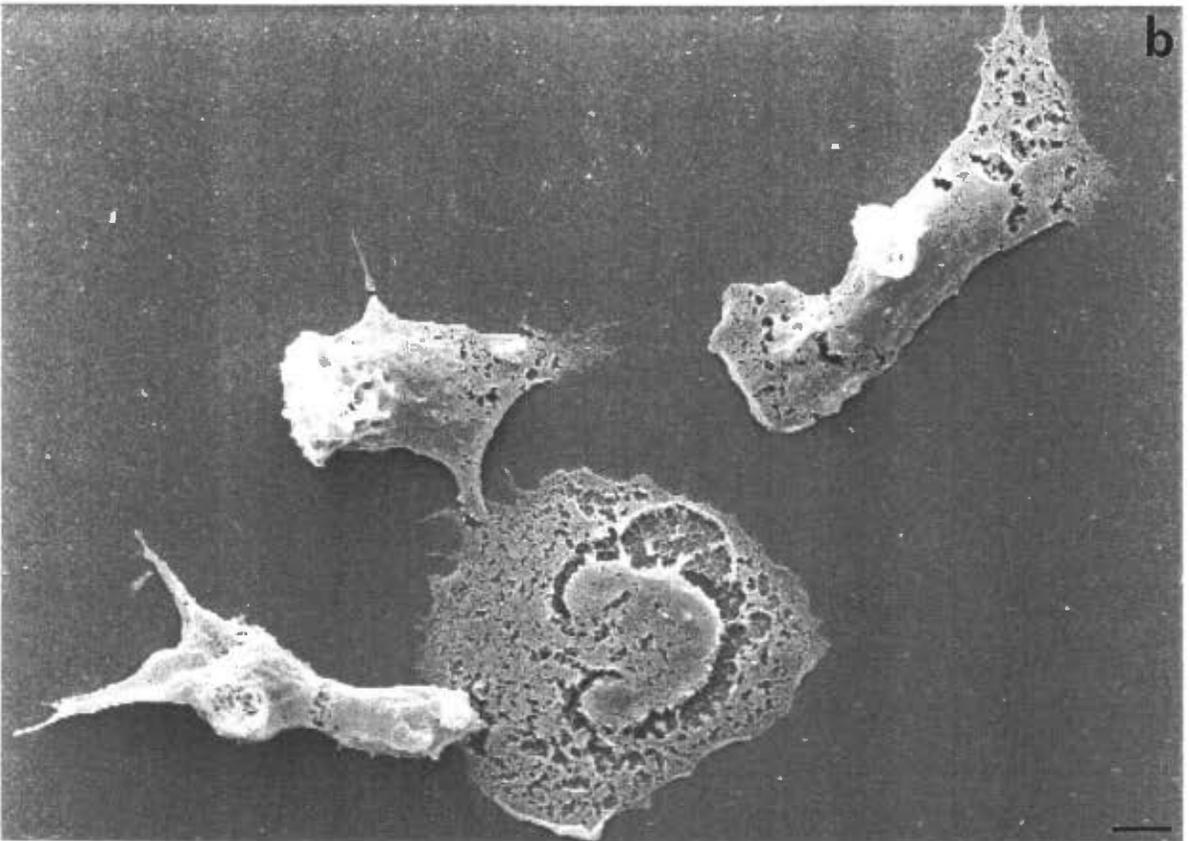
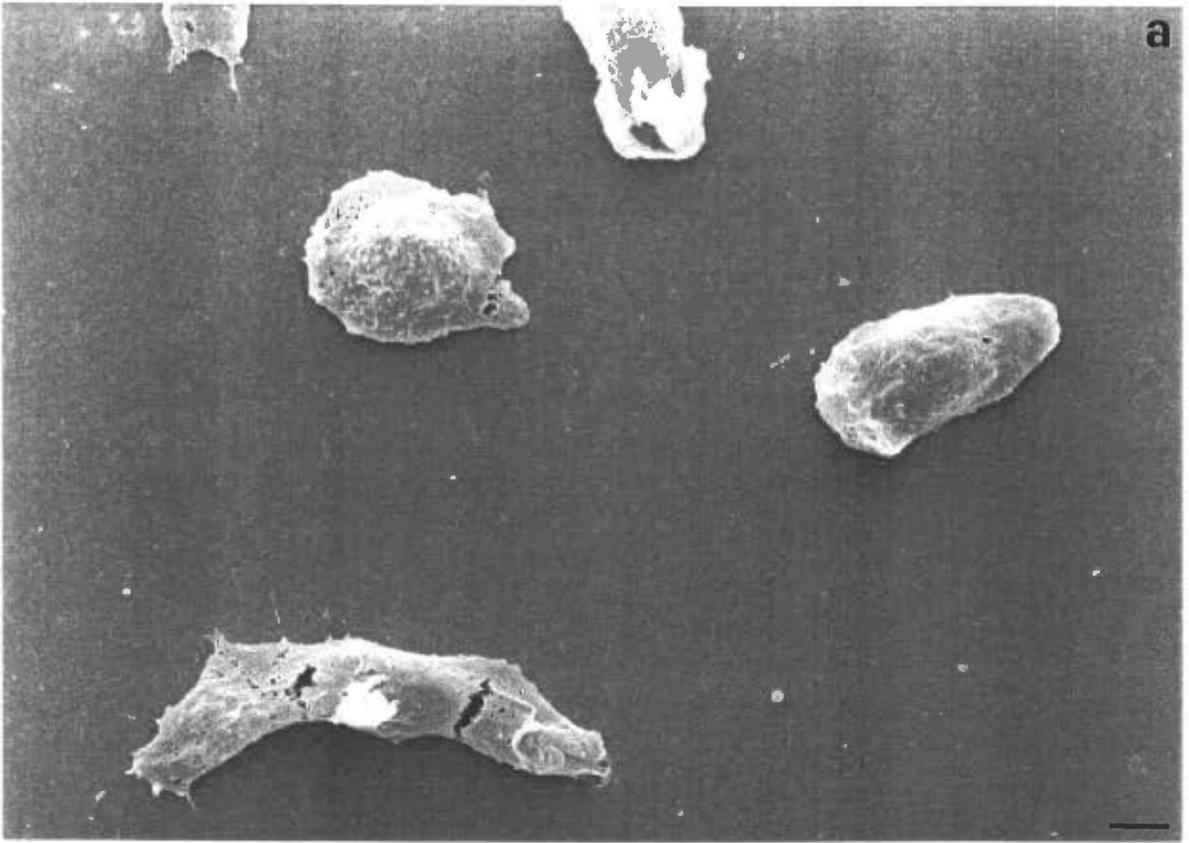
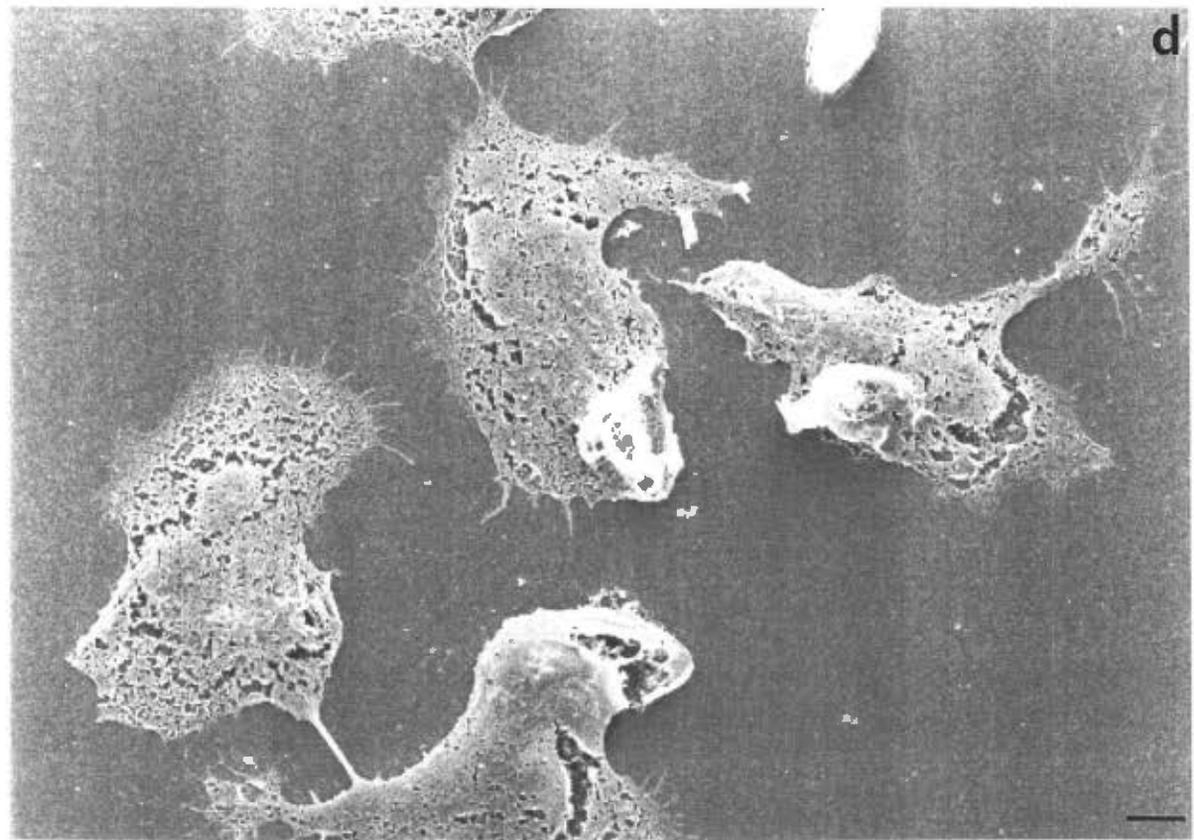
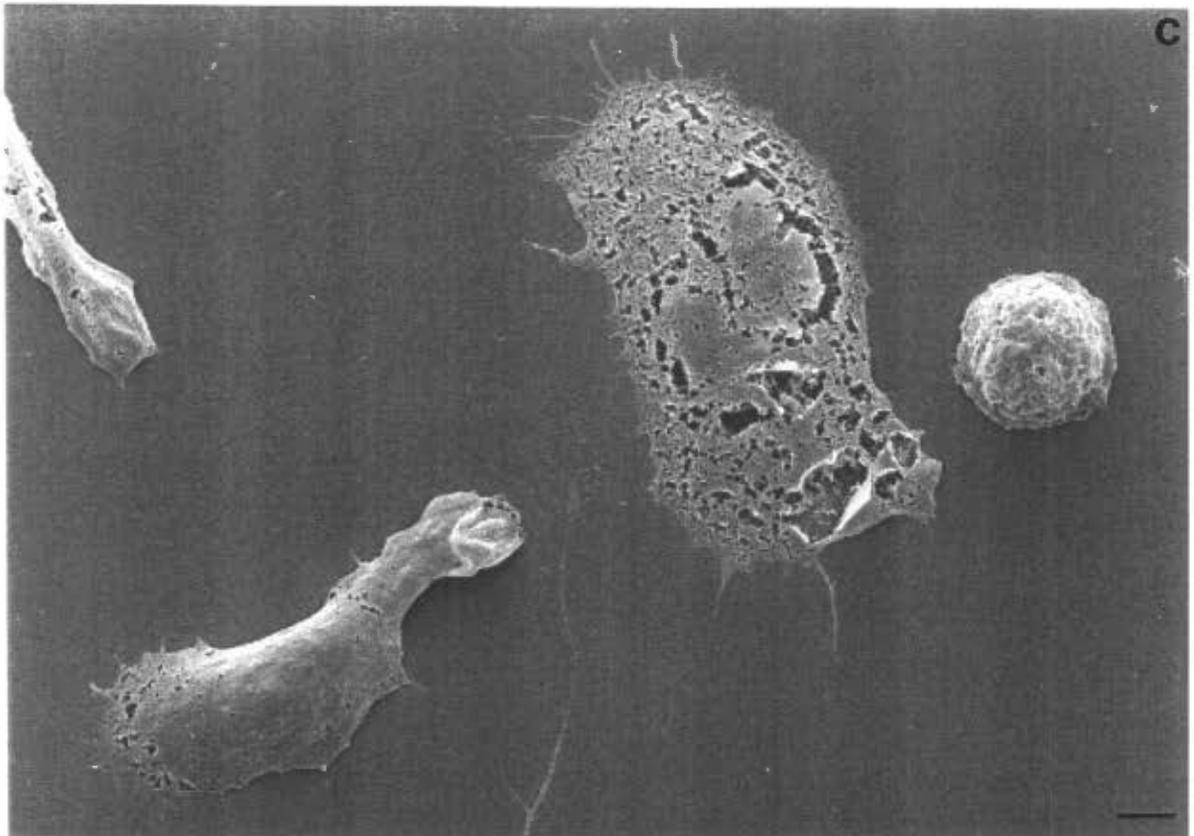


Figura 5. Effetto del Mn^{2+} sulla morfologia di PMN resting e stimolati con TNF su LM e FN: immagini al microscopio elettronico a scansione. Le condizioni sperimentali erano come descritto per la Fig 2; nelle prove veniva inoltre aggiunto $MnCl_2$ (c.f.:1 mM). Dopo 30' di incubazione a 37°C le cellule venivano fissate con glutaraldeide; si procedeva infine all'allestimento dei campioni per la microscopia a scansione (MATERIALI E METODI, cap. 6). **Pannello I:** PMN su LM in condizioni *resting* (a) e stimolati con TNF (b). **Pannello II:** PMN su FN in condizioni *resting* (c) e stimolati con TNF (d). (barre = 3 μm).





forma allungata gli pseudopodi diventano lunghissimi e sottili: il contatto con la LM si è fatto senza dubbio più intimo.

Qual è la conseguenza di questo «*spreading* indotto» sul metabolismo ossidativo dei PMN stimolati con TNF? Non ci è stato possibile valutarlo in base alla produzione di O_2^- con il metodo del citocromo c (vedi «MATERIALI E METODI», cap. 4, Ia), in quanto il Mn^{2+} interferisce pesantemente con il sistema; siamo ricorsi quindi alla valutazione dell'altro aspetto del *burst* metabolico nei neutrofilo: l'attivazione dello *shunt* dei pentosi.

I risultati ottenuti sono presentati nella *Figura 6*. Sebbene anche in questa serie di esperimenti il Mn^{2+} si riveli estremamente efficace come stimolo proadesivo (vedi inserto), l'attività metabolica dei PMN stimolati con TNF su LM rimane insignificante. Ciò non si può d'altronde ascrivere ad una eventuale tossicità del Mn^{2+} : in sua presenza la risposta ossidativa al TNF delle cellule su FN resta inalterata.

L'idea che se ne ricava è che lo *spreading* è un requisito necessario ma non sufficiente a consentire il *burst* respiratorio dei PMN in risposta al TNF. In altre parole, ci dev'essere evidentemente una differenza tra PMN *spread* su FN e PMN *spread* su LM, che risulta fondamentale nel determinare se la cellula stimolata con TNF respirerà o meno.

4. Polimerizzazione dell'actina citoscheletrica in PMN a riposo e stimolati con TNF: influenza delle condizioni di adesione

Allo scopo di trovare un criterio oggettivo per distinguere lo *spreading* produttivo in termini metabolici da quello inadeguato ai fini del *burst*, è stato condotto uno studio sul grado di polimerizzazione dell'actina citoscheletrica in funzione delle diverse condizioni sperimentali fin qui analizzate. Avevamo infatti ipotizzato che il contenuto complessivo di actina filamentosa (F-actina) nei PMN avrebbe potuto essere indice delle differenze qualitative tra adesione *spread* su FN e su LM.

Il grafico della *Figura 7* rappresenta un quadro informativo delle modificazioni citoscheletriche quantitative cui i PMN vanno incontro a seconda delle loro condizioni di adesività e di attivazione. Analizzando ciò che accade a livello resting, risulta già evidente come il tipo di substrato contattato influenzi profondamente il comportamento cellulare: rispetto ai PMN incubati su MT, quelli adesi a LM rivelano un'accentuata diminuzione del contenuto di F-actina; tale diminuzione è invece molto meno marcata qualora i neutrofilo si trovino a contatto con la FN [121].

Figura 6. Effetto del Mn^{2+} sullo shunt dei pentosi in PMN a riposo e stimolati con TNF. Le cellule ($100 \mu\text{l/prova}$ di una sospensione a 3×10^6 PMN/ml in HEPES•ioni^{gl}) venivano dispensate in pozzetti di piastre per coltura rivestiti con FN o LM, contenenti $0.5 \mu\text{Ci}$ di D-[1-¹⁴C] glucosio e, nelle prove che lo richiedevano, TNF (c.f.:10 ng/ml) e $MnCl_2$ (c.f.:1 mM) in $200 \mu\text{l}$ di HEPES•ioni^{gl}. Dopo aver sigillato i pozzetti con tappi di gomma, ognuno dei quali era dotato di un pozzettino interno contenente $200 \mu\text{l}$ di KOH al 10 %, la piastra veniva posta in un incubatore umidificato a 37°C . Dopo 60' di incubazione, in ciascun pozzetto venivano iniettati 0.5 ml di HCl 1 N e la piastra veniva messa a 4°C per tutta la notte. Il giorno successivo si quantizzava il glucosio ossidato dai PMN misurando la radioattività associata a $150 \mu\text{l}$ di KOH prelevati da ogni pozzettino, come spiegato in dettaglio nel cap. 4, Ib della sezione MATERIALI E METODI. Nel grafico sono riportate le medie \pm ES dei risultati di 5 esperimenti condotti in duplicato. L'inserto del grafico illustra i risultati dei *test* di adesione (MATERIALI E METODI, cap. 4 II, lavaggio a $200 \times g$) condotti contemporaneamente ai saggi metabolici, utilizzando PMN provenienti dalle stesse sospensioni cellulari e sottoponendoli alle medesime condizioni sperimentali (unica differenza: si ometteva il glucosio radioattivo dal mezzo di incubazione). L'analisi statistica dei risultati, espressi come medie \pm ES, è stata effettuata utilizzando il *test* t di Student su dati non appaiati (due code). * = significativo con $p < 0.05$; ** = significativo con $p < 0.01$; *** = significativo con $p < 0.001$.

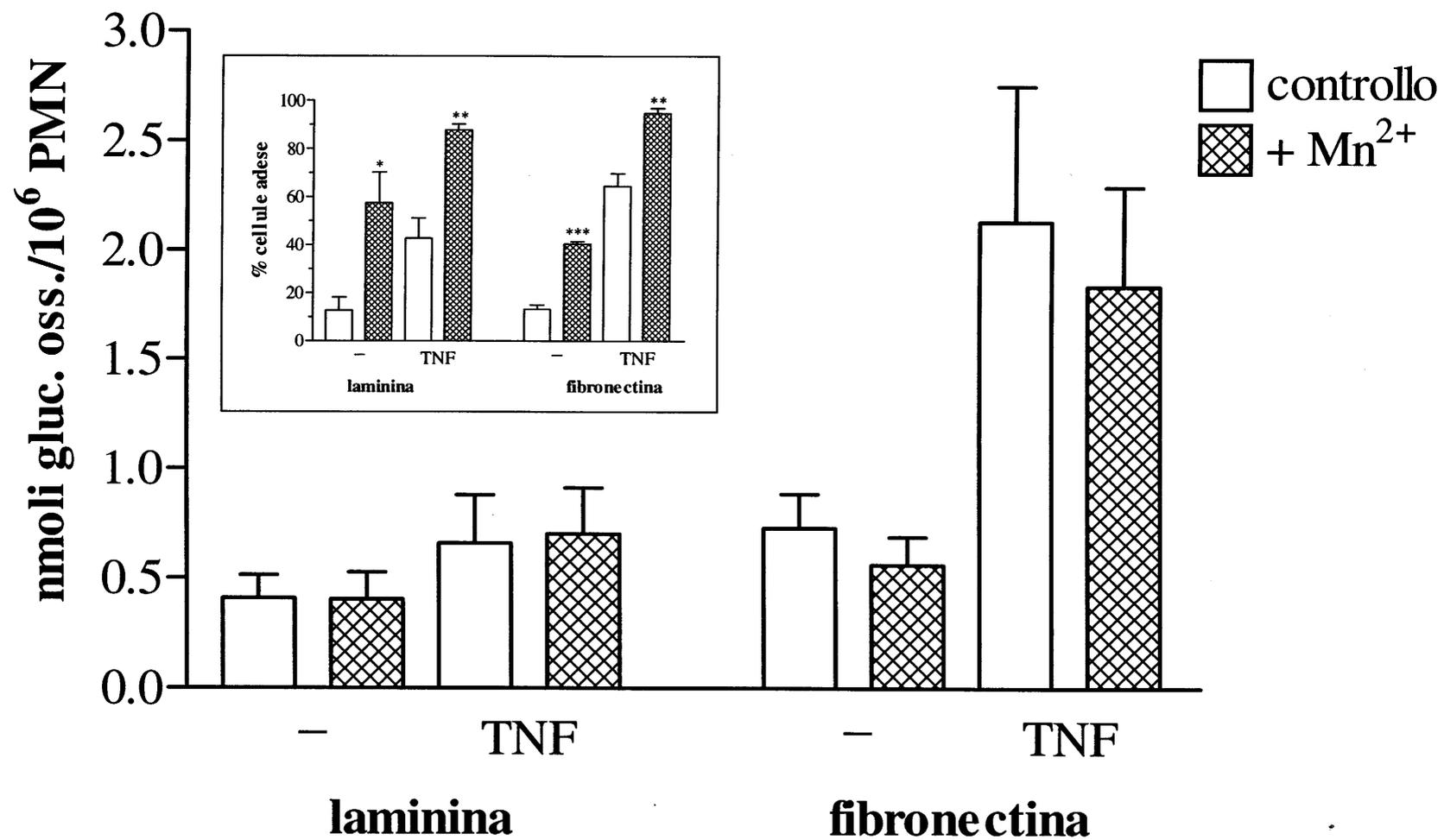
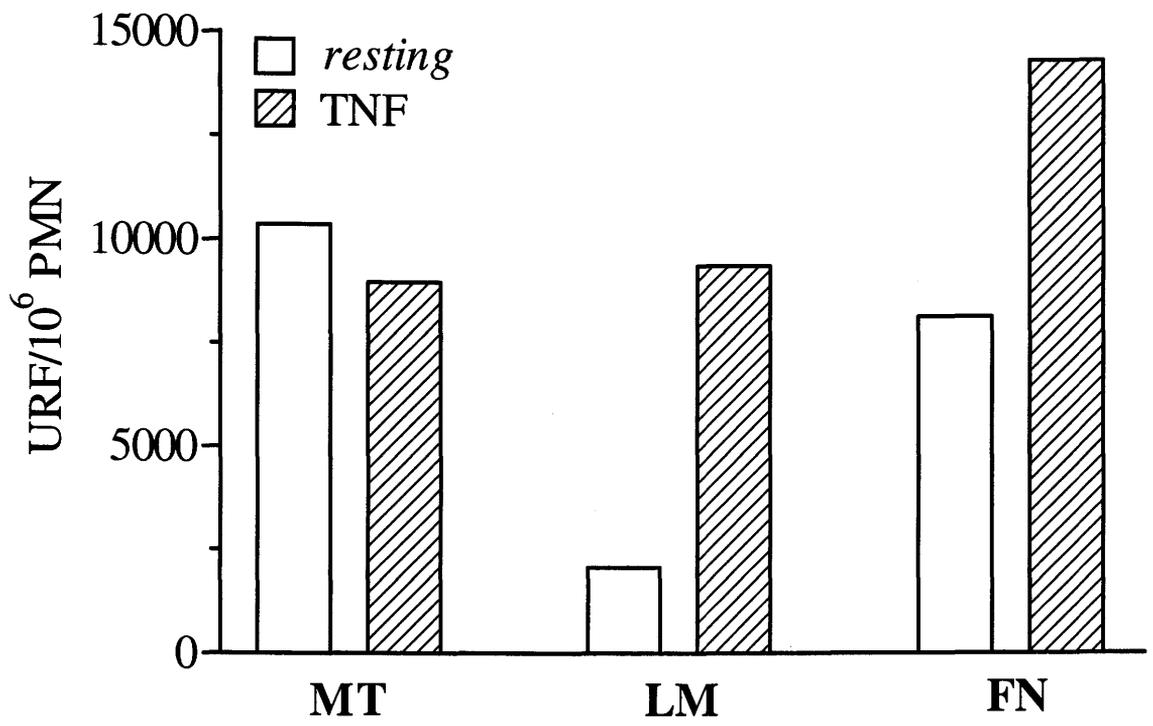


Figura 7. Contenuto di actina filamentosa in PMN a riposo e stimolati con TNF. 0.6×10^6 PMN/prova venivano incubati per 30' a 37°C con o senza TNF (10 ng/ml in 300 μ l finali di HEPES•ioni) in pozzetti di piastre per coltura rivestiti con MT, LM o FN. Le cellule venivano quindi fissate in formalina (15' a temperatura ambiente) e, dopo 3 lavaggi in PBS che si ripetevano ad ogni passaggio successivo, trattate per 15' a 37°C con NBD fallacidina 1.65×10^{-7} M in PBS. In ogni pozzetto venivano poi dispensati 0.7 ml di metanolo assoluto e la piastra veniva posta a 4°C per 1h. Si risaliva infine alla quantità di F-actina totale misurando la fluorescenza associata a 0.6 ml prelevati da ciascun pozzetto, come descritto in MATERIALI E METODI, cap. 5a. Il grafico illustra i risultati di un esperimento rappresentativo di 3, condotto in duplicato.



Anche l'aggiunta del TNF al mezzo di incubazione ha effetti diversi, e persino opposti, a seconda della superficie utilizzata: su MT i PMN rispondono alla citochina con una depolimerizzazione citoscheletrica, mentre sia su LM che su FN si registra invece un notevole incremento nel contenuto di F-actina. In particolare, il grado di polimerizzazione dei PMN stimolati con TNF su LM diventa sovrapponibile a quello delle cellule stimolate su MT e delle cellule *resting* su FN, laddove la quantità di F-actina dei PMN attivati su FN raggiunge livelli significativamente più elevati rispetto a tutte le altre condizioni. Tutti questi cambiamenti a carico del citoscheletro si possono apprezzare visivamente nella *Figura 8*, che raccoglie fotografie di preparati in cui la F-actina è stata marcata con una sonda fluorescente.

Il tipo di substrato è quindi determinante nel modulare l'assetto citoscheletrico dei neutrofili, sia basalmente che in condizioni di stimolazione. Sulla LM i PMN non superano mai il grado di polimerizzazione tipico delle cellule in sospensione, manifestando anzi, in condizioni *resting*, una marcata depolimerizzazione del citoscheletro; questo potrebbe essere indicativo di una tendenza dei neutrofili in contatto con questo substrato alla mobilità, piuttosto che alla relativa staticità di un'adesione *spread*. Sulla FN il grado di polimerizzazione è ben superiore a quello sulla LM sia nelle cellule a riposo sia, soprattutto, in seguito a stimolazione con TNF; il livello *resting* di F-actina, non dissimile da quello delle cellule in sospensione, rappresenterebbe pertanto, su questa superficie, la fase di transizione verso una polimerizzazione più spinta (TNF), sfociante nello *spreading*.

Cosa accade al contenuto di F-actina quando le cellule vengono incubate in presenza di Mn^{2+} ? Vi è una differenza quantitativa tra polimerizzazione citoscheletrica associata allo *spreading* su FN e quella legata allo *spreading* su LM?

Nella *Figura 9* sono illustrati i risultati di quest'indagine; essi rivelano, ed era prevedibile, che il Mn^{2+} induce sempre un incremento notevole dell'F-actina. Soprattutto si nota come i PMN stimolati con TNF su LM raggiungano, grazie al Mn^{2+} , un grado di polimerizzazione del citoscheletro sovrapponibile a quello abitualmente associato ai PMN attivati su FN. D'altra parte queste osservazioni ricalcano in larga misura quanto già visto a proposito dell'adesione indotta da Mn^{2+} ; complessivamente quindi, si deve ammettere l'impossibilità di discriminare situazioni di *spreading* qualitativamente diverse in base al contenuto totale di actina polimerizzata.

Da quanto fin qui appurato appare chiaro che, per quanto si possa esasperare l'adesione dei PMN alla LM nel tentativo di mimare ciò che accade su FN, la LM non

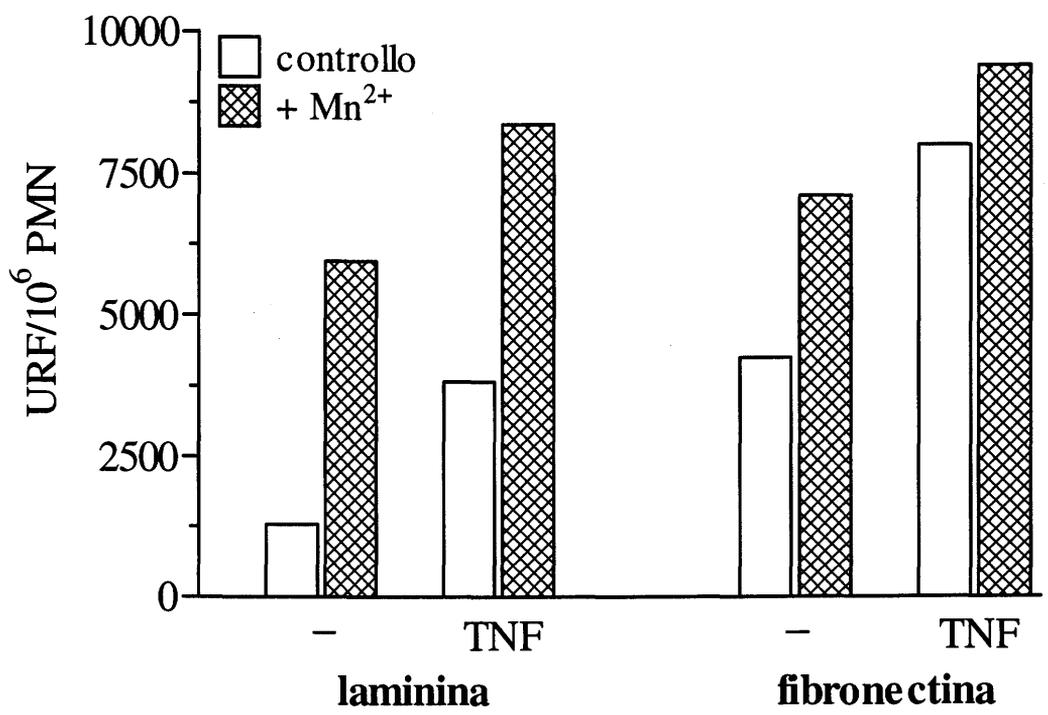
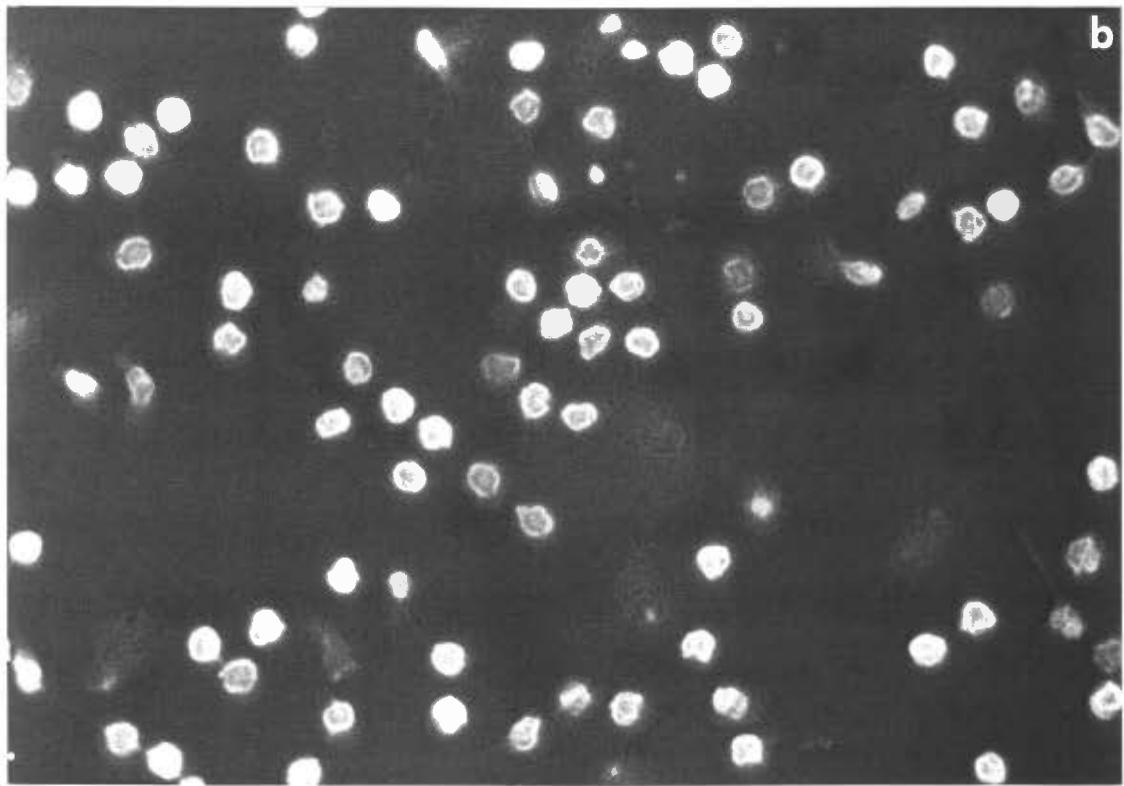
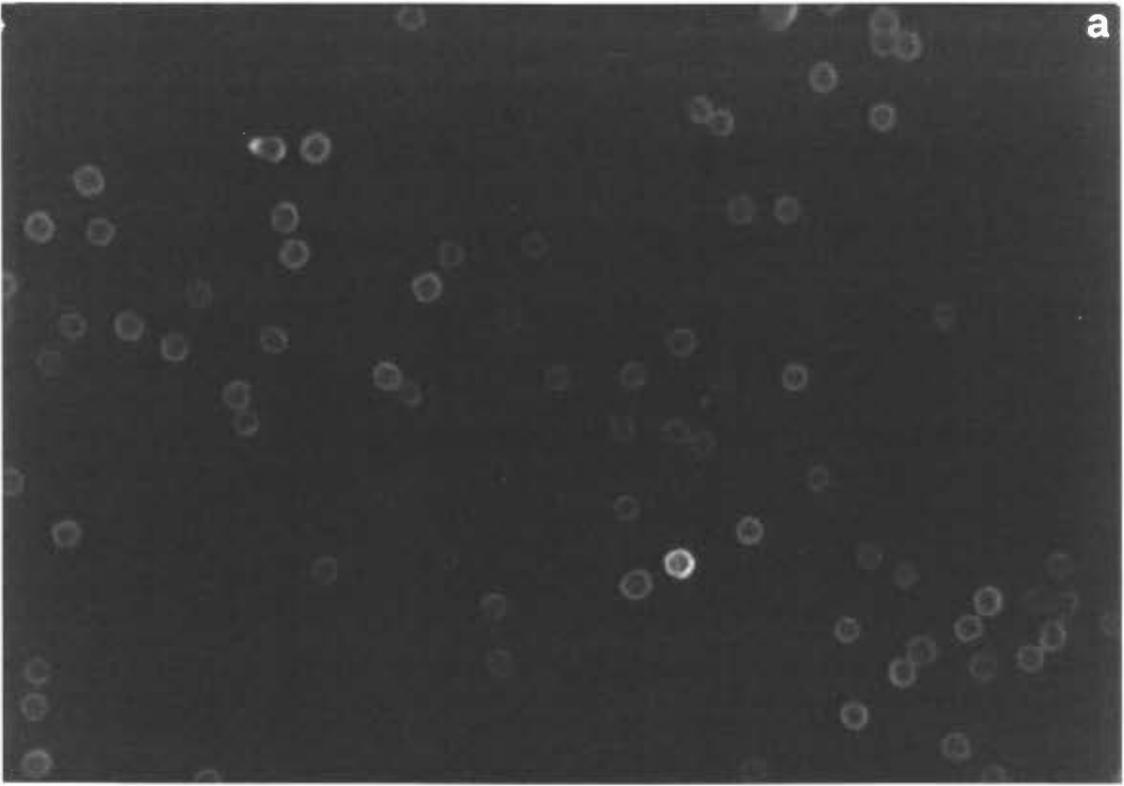


Figura 8. Immagini al microscopio a fluorescenza di PMN resting e stimolati con TNF su LM e FN: visualizzazione del citoscheletro. Le cellule venivano dispensate su vetrini coprioggetto collocati sul fondo di pozzetti di piastre per coltura e rivestiti con LM o FN; le altre condizioni sperimentali e la procedura per marcare il citoscheletro actinico erano come descritto per la *Fig.7*. Al termine dell'incubazione con NBD fallacidina, i vetrini venivano recuperati dal fondo dei pozzetti ed allestiti per l'osservazione al microscopio a fluorescenza come descritto in MATERIALI E METODI, cap. 5b. **Pannello I:** PMN in condizioni *resting* su LM (*a*) e su FN (*b*). **Pannello II:** PMN stimolati con TNF su LM (*c*) e su FN (*d*). (800x)



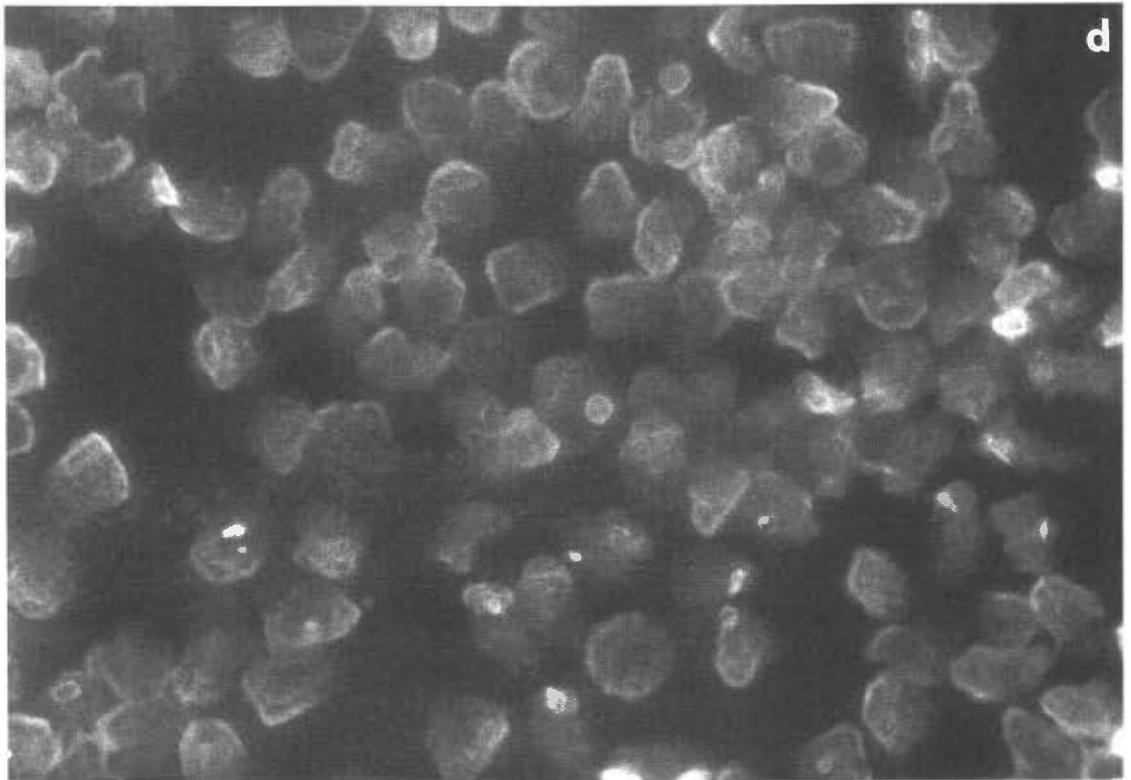
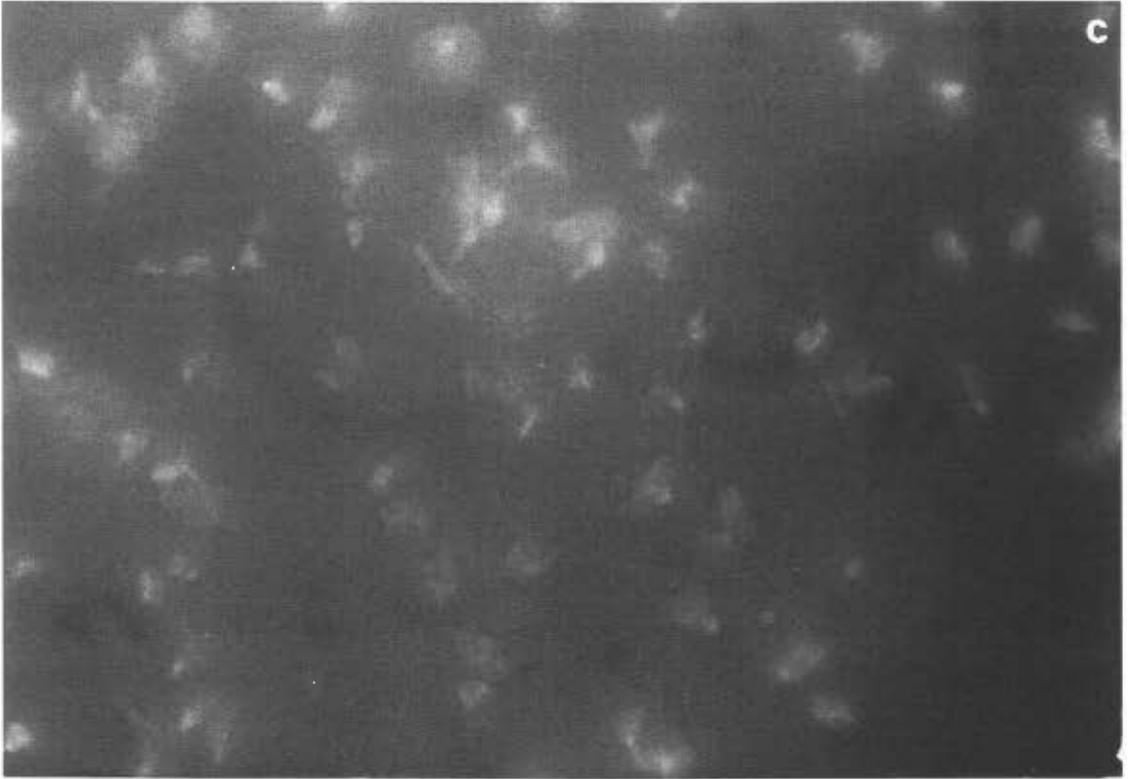


Figura 9. Effetto del Mn^{2+} sulla polimerizzazione dell'actina in PMN a riposo e stimolati con TNF. Le cellule (0.6×10^6 PMN/prova) venivano incubate per 30' a $37^\circ C$ in pozzetti di piastre per coltura rivestiti con LM o FN, contenenti o meno TNF (c.f.:10 ng/ml) e $MnCl_2$ (c.f.: 1 mM) in 0.6 ml finali di HEPES•ioni. Al termine dell'incubazione il contenuto di actina filamentosa si determinava marcando l'actina stessa con NBD fallacidina e misurando la fluorescenza associata al citoscheletro come descritto nel cap. 5a dei MATERIALI E METODI. I dati illustrati si riferiscono ad un esperimento rappresentativo di 3, condotto in duplicato.

risulta permissiva al *burst* respiratorio inducibile da TNF. Poiché il «dialogo» PMN-MEC avviene attraverso le integrine, è lecito ipotizzare che i fattori determinanti la variabilità comportamentale di queste cellule a seconda del substrato contattato possano essere ricercati proprio a questo livello; si può quindi investigare se la permissività o meno nei confronti del *burst* TNF-dipendente tragga origine da un coinvolgimento differenziale delle integrine espresse dai neutrofili.

5. Caratterizzazione molecolare dell'adesione dei PMN a FN e a LM: dipendenza da integrine β_2

a) Espressione di integrine β_1 e β_2 in PMN a riposo e stimolati con TNF

Per avere la certezza che dopo aver subito il processo di separazione dal sangue (vedi cap. 1 dei MATERIALI E METODI) i PMN nelle nostre mani conservassero il corredo integrinico documentato in letteratura [120, 122, 123], è stata condotta inizialmente l'analisi citofluorimetrica illustrata nella *Figura 10*. Sapendo che le interazioni dei PMN con LM e FN sono mediate da integrine appartenenti alle sottofamiglie β_1 e β_2 , abbiamo valutato l'espressione di queste molecole sia in cellule *resting* che stimolate con TNF; si è potuto così constatare che le popolazioni cellulari da noi utilizzate espongono sulla superficie entrambi i tipi di integrine, in proporzioni paragonabili a quelle già documentate. Dai dati presentati si può inoltre verificare l'effetto del TNF sui livelli di espressione: in linea con i dati di letteratura [22, 65] si osserva iperespressione delle integrine β_2 , risultato dell'azione degranulante della citochina; il corredo di membrana delle β_1 appare invece inalterato dopo esposizione dei PMN al TNF, aspetto questo in contrasto con quanto visto da alcuni autori [123] ma concorde con risultati più recenti [119].

b) Ruolo delle integrine β_1 e β_2 nell'adesione TNF-dipendente dei PMN a FN e LM

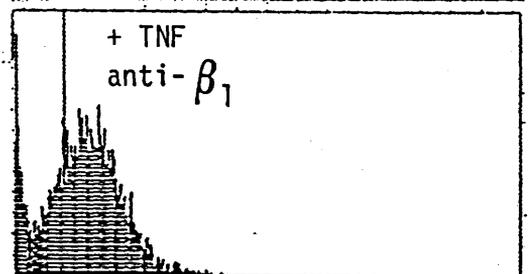
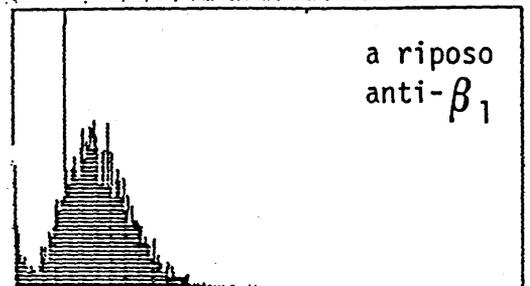
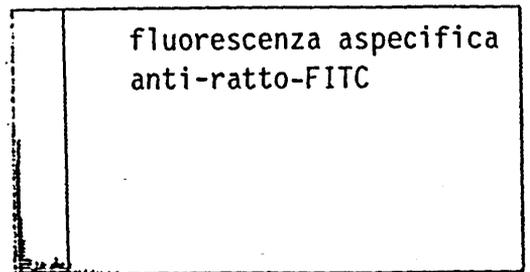
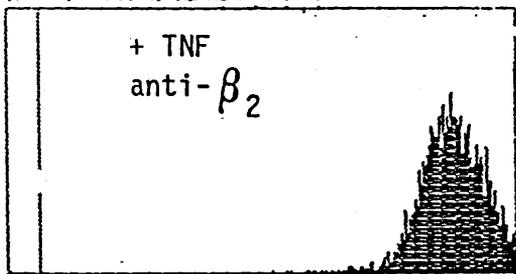
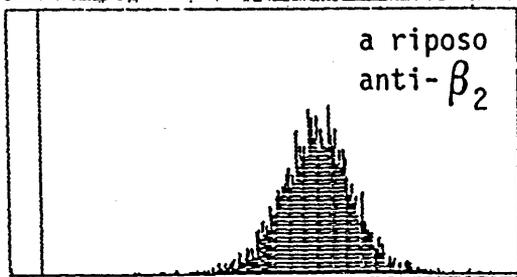
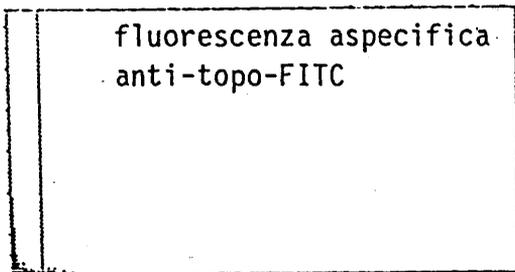
Il passo successivo è stato quello di valutare il ruolo di questi due sottogruppi di molecole recettoriali nell'adesione dei neutrofili stimolati con TNF su FN e su LM.

Come si può notare osservando i grafici riportati nella *Figura 11*, le integrine appartenenti alla sottofamiglia β_1 appaiono estranee ad entrambe le condizioni di adesione, mentre l'aumento del numero di cellule adese rispetto alla condizione *resting* è interamente attribuibile al coinvolgimento delle β_2 . Infatti:

1. l'anticorpo monoclonale anti β_1 da noi utilizzato (mAb 13) non inibisce in alcuna misura l'adesione a FN, né quella a LM;

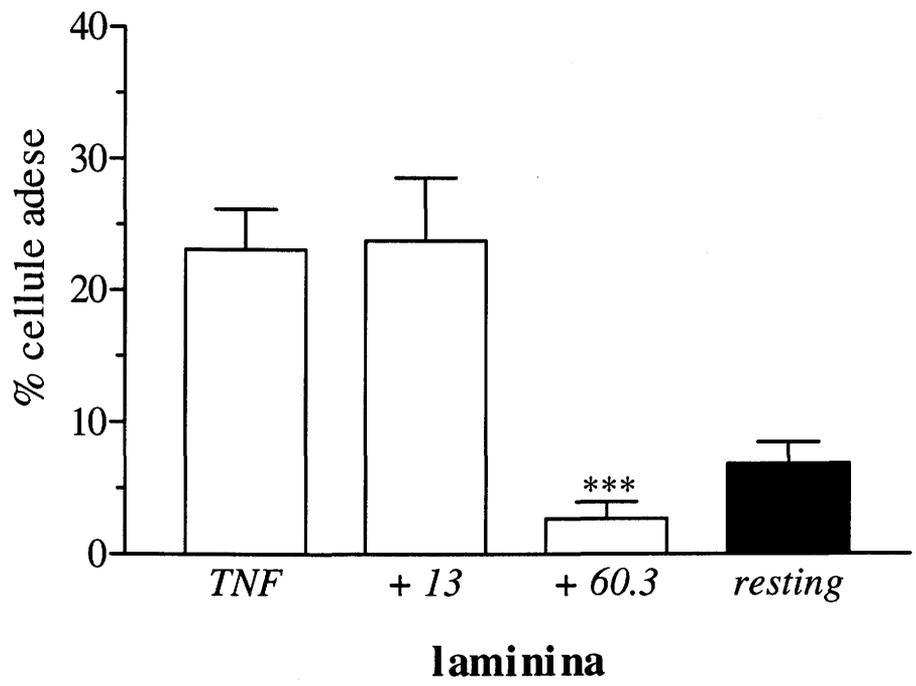
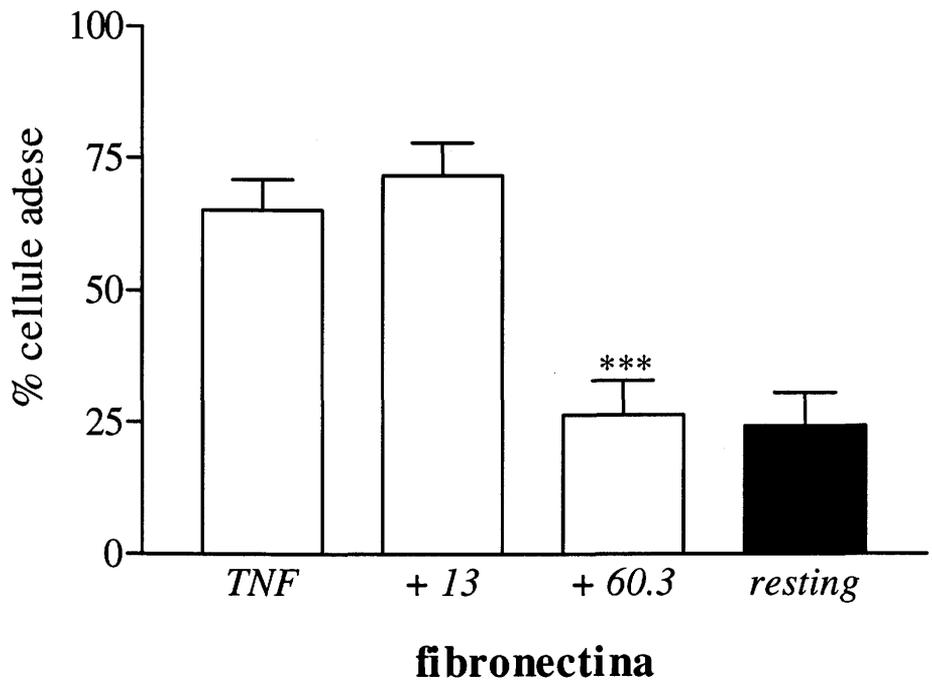
Figura 10. Espressione di integrine β_1 e β_2 in PMN resting e stimolati con TNF. Le cellule (1.5×10^6 PMN/ml in HEPES•ioni) venivano incubate per 20' a 37°C, in sospensione, con o senza TNF (c.f.: 10 ng/ml). Al termine dell'incubazione si ponevano le provette in ghiaccio per 15' e le cellule, suddivise in sottopopolazioni di 0.45×10^6 PMN/prova, venivano incubate per 45' con mAb 13 (anti β_1) o con mAb 60.3 (anti β_2) alla concentrazione di 2-4 $\mu\text{g/ml}$. Dopo due lavaggi in PBS freddo le cellule venivano incubate per 30' con un F(ab')₂ fluoresceinato anti topo o anti ratto, a 2 $\mu\text{g/ml}$ in PBS. I PMN, lavati altre due volte con PBS freddo, venivano quindi fissati in formalina al 2 % ed infine le sospensioni cellulari si analizzavano utilizzando un citofluorimetro a flusso (MATERIALI E METODI, cap. 7). L'immunofluorescenza aspecifica si valutava misurando l'intensità di fluorescenza associata alla popolazione di controllo, che era stata incubata solamente con il 2° anticorpo. Vengono mostrati i tracciati citofluorimetrici relativi ad un esperimento, rappresentativo di 4.

numero di cellule



intensità di fluorescenza

Figura 11. Adesione a FN e a LM di PMN stimolati con TNF in presenza di mAb anti catene β integriniche. 75×10^3 PMN/prova venivano incubati per 45' a 37°C in pozzetti rivestiti con FN o LM e contenenti o meno TNF (c.f.: 10 ng/ml) e i mAb (c.f.: 10 $\mu\text{g/ml}$) in complessivi 150 μl di HEPES•ioni. Dopo un lavaggio effettuato mediante centrifugazione (5' a $200 \times g$) dei pozzetti riempiti con PBS, tappati e capovolti, la quantità di cellule rimaste adese si valutava con un saggio enzimatico colorimetrico come descritto in MATERIALI E METODI, cap. 4, II. Nei grafici sono rappresentate le medie \pm ES dei risultati ottenuti da 6 esperimenti condotti in duplicato. Il livello di significatività dei dati, determinato mediante *test t* di Student su dati non appaiati (una coda), si riferisce al confronto tra i valori di adesione indotta da TNF ottenuti in presenza ed in assenza di mAb. *** = significativo con $p < 0.001$.



2. anche nell'ipotesi remota che il mAb 13 non riesca ad interferire con l'interazione integrine β_1 -substrato (il che contrasterebbe con la sua documentata efficacia inibente [119]), si può constatare che su entrambe le superfici il mAb anti β_2 (60.3) è in grado di annullare completamente l'effetto proadesivo del TNF, riportando la percentuale di cellule adese a valori basali (FN) o addirittura inferiori (LM). Ciò esclude ulteriormente una partecipazione delle β_1 all'adesione dei PMN stimolati con TNF sulle due proteine di matrice.

Sebbene vi siano evidenze sperimentali sul contributo delle β_1 all'adesione su LM, esse sono rilevabili solo con la simultanea presenza nel saggio di un anticorpo anti β_1 e uno anti β_2 [119]; si può allora ipotizzare che usando i mAb 60.3 e 13 in miscela avremmo forse ottenuto un completo distacco dei PMN dalla LM, ma ciò esulava dallo scopo della nostra ricerca.

Com'era facile prevedere, il mAb 60.3, inibendo drasticamente l'adesione a FN dei PMN trattati con TNF, abbattava parallelamente anche la produzione di O_2^- ad essa associata (*Figura 12*); ciò conferma la dipendenza dall'adesione del *burst* respiratorio indotto da TNF e, in particolare, dimostra che sulla FN tale *burst* è associato ad un'adesione mediata da integrine β_2 [97, 98, 115].

Questa serie di esperimenti ci ha permesso di verificare che l'adesione dei PMN stimolati con TNF è sostenuta, su entrambe le proteine di matrice, da integrine della sottofamiglia β_2 ; ciò lasciava però irrisolto il problema di capire a cosa fosse imputabile la differente capacità dei PMN sulle due superfici di rispondere metabolicamente al TNF.

c) Integrine β_2 espresse dai PMN: distribuzione di membrana in condizioni resting e dopo trattamento con TNF

I neutrofili espongono sulla loro superficie tre dei quattro membri appartenenti alla sottofamiglia delle integrine leucocitarie: $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$ [8, 119, 120]. Ci si è chiesti pertanto se il diverso comportamento adesivo e metabolico manifestato dai PMN su FN e su LM fosse attribuibile al coinvolgimento differenziale di questi tre tipi di integrine. Prima di indagare su questa possibilità, abbiamo ritenuto opportuno verificare la distribuzione relativa delle integrine β_2 nelle popolazioni cellulari da noi utilizzate.

La *Figura 13* offre un quadro dell'espressione di tali molecole sia in condizioni di riposo che di stimolazione con TNF. In linea con i dati di letteratura [8, 65, 125] si può notare che $\alpha_L\beta_2$ non viene iperespressa dopo trattamento con TNF, mentre risultano invece inducibili $\alpha_M\beta_2$ e, in misura minore, $\alpha_X\beta_2$. In definitiva, $\alpha_M\beta_2$ è l'integrina β_2

Figura 12. Risposta metabolica al TNF da parte di PMN adesi a FN in presenza di mAb anti catene β integriniche. Le cellule (75×10^3 PMN/prova) venivano incubate per 45' a 37°C in pozzetti rivestiti con FN, contenenti citocromo c (c.f.:12 mM) e, nelle prove che lo richiedevano, TNF (c.f.: 10 ng/ml) e i mAb indicati (c.f.: 10 μ g/ml) in 150 μ l totali di HEPES•ioni. Il metabolismo ossidativo, misurato in nmoli di O_2^- prodotte, si valutava mediante letture spettrofotometriche del citocromo c ridotto (MATERIALI E METODI, cap. 4, Ia). I dati illustrati nel grafico sono le medie \pm ES dei risultati di 6 esperimenti condotti in duplicato. L'analisi statistica, basata sul *test t* di Student su dati non appaiati (una coda), è stata effettuata confrontando i valori ottenuti in presenza dei mAb con quelli relativi alle cellule incubate con il solo TNF. *** = significativo con $p < 0.001$.

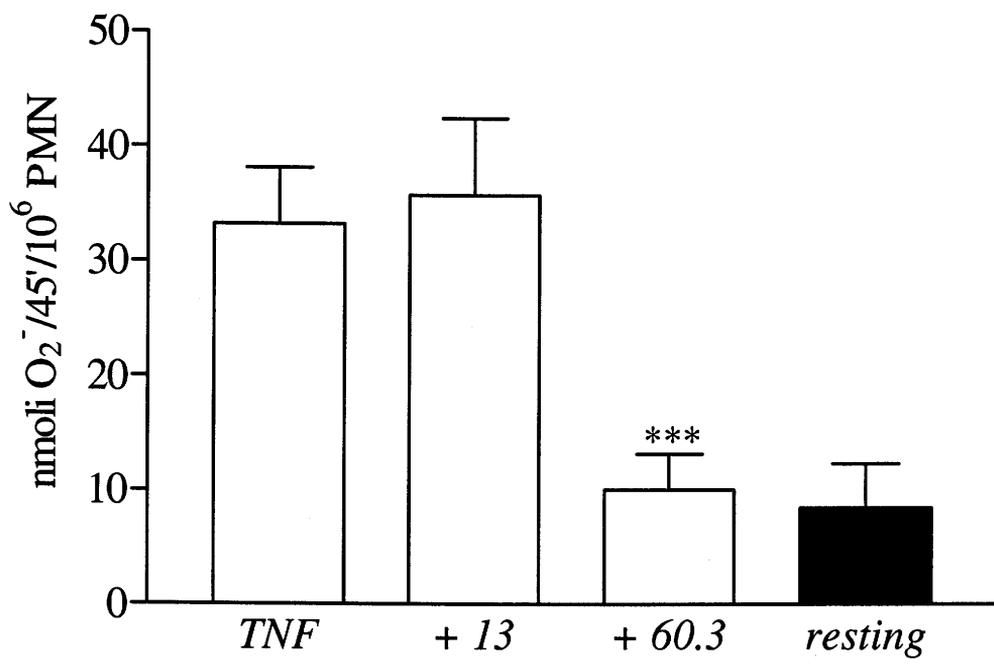
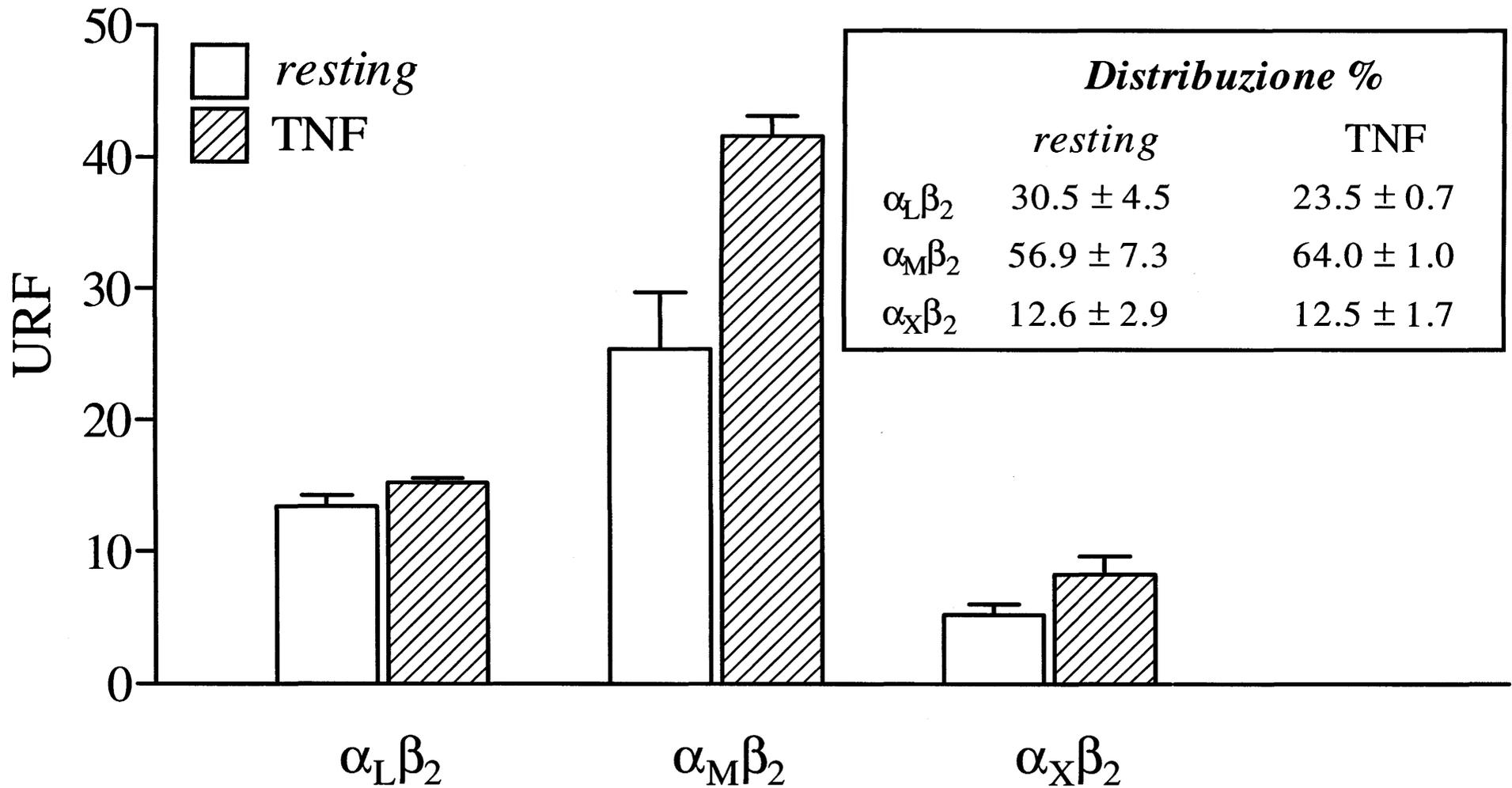


Figura 13. Espressione delle integrine β_2 in PMN a riposo e stimolati con TNF. Le condizioni sperimentali erano uguali a quelle descritte nella didascalia della *Fig. 10*, tranne il tipo di mAb utilizzati, che erano: *TS1/22* (anti α_L), *MY/904* (anti α_M), *3.9* (anti α_X). La scala di valutazione, espressa in unità di fluorescenza relativa (UFR), veniva tarata in base all'immunofluorescenza aspecifica associata ad una popolazione di controllo, che era stata incubata con il 2° anticorpo (F(ab')₂ FITC anti topo) ma non con il 1°. I dati rappresentati nel grafico sono le medie \pm ES dei risultati di 4 esperimenti. I dati di distribuzione percentuale mostrati nel riquadro si riferiscono agli stessi esperimenti e sono espressi come medie \pm ES.



maggiormente rappresentata sulla membrana plasmatica dei PMN, seguita da $\alpha_L\beta_2$ e da $\alpha_X\beta_2$. Questa distribuzione relativa resta qualitativamente invariata prima e dopo incubazione con TNF (vedi riquadro); la citochina non fa che aumentare lievemente la distribuzione percentuale di $\alpha_M\beta_2$ a sfavore di $\alpha_L\beta_2$.

d) Effetto di mAb anti catene α -integriniche sull'adesione a FN e a LM di PMN stimolati con TNF

Poiché avevamo ipotizzato che l'interazione dei neutrofili con FN e con LM potesse avvenire attraverso integrine β_2 diverse o che, a parità di molecole, esse venissero coinvolte in differenti proporzioni a seconda della superficie, si è deciso di sondare questa duplice possibilità mediante l'utilizzo di mAb specifici per ciascuna catena α -integrinica (vedi *Tab. II* a pag. 20).

L'aggiunta dei singoli mAb nel saggio permetteva di escludere dal contatto con il substrato un tipo di integrina β_2 alla volta; il ruolo di ciascuna di esse poteva quindi venir evidenziato in maniera indiretta, valutando l'effetto di questo «*knock-out*» molecolare sulla percentuale di cellule adese; un'inibizione più o meno marcata dell'adesione indotta da TNF sarebbe stata indice del coinvolgimento dell'integrina stessa nel fenomeno studiato.

La *Tabella V* illustra l'effetto dei mAb anti α sull'adesione a LM e a FN dei PMN stimolati con TNF; osservando i dati relativi alla LM, salta agli occhi la drastica inibizione da parte dell'anticorpo anti α_M (*MI/70*); risulta di inferiore entità, ma nettamente significativa, quella da anti α_X (*3.9*), mentre è nullo l'effetto dell'anti α_L (*TS1-22*). Ciò porterebbe a concludere che nel fenomeno adesivo in questione sono coinvolte le integrine $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$, ma non $\alpha_L\beta_2$.

Prendendo in esame i dati relativi alla FN, si constata invece che nessuno dei mAb utilizzati ha effetto inibitorio sull'adesione indotta da TNF a questa superficie. Questi risultati contrastano con il dato di fatto che tale interazione è senz'altro β_2 -dipendente (*Fig. 11*) [91, 97, 98], né ci si può appellare ad una presunta inefficacia degli anticorpi adoperati, poichè la capacità inibente di ognuno di questi anticorpi è documentata [124-127] e per quanto riguarda in particolare *TS1-22* e *MI/70*, si sa che sono diretti proprio contro il sito di riconoscimento del ligando (*I-domain*, vedi INTRODUZIONE, cap. 7) [110, 111]. Tutt'al più l'incongruenza potrebbe essere spiegata ammettendo il coinvolgimento di tutte e tre le integrine β_2 nell'adesione forte a FN: mettendo fuori gioco un solo tipo di integrina

Tabella V. Adesione a LM e FN di PMN stimolati con TNF in presenza di mAb anti catene α integriniche

condizioni	laminina % cellule adese	fibronectina % cellule adese
controllo	27.4 \pm 3.6	60.2 \pm 5.1
+ TS1-22	29.0 \pm 3.6	63.9 \pm 3.8
+ M1/70	12.9 \pm 4.0 ***	59.6 \pm 6.3
+ 3.9	23.7 \pm 3.9 *	57.4 \pm 2.7
+ BB7.5	29.9 \pm 5.8	66.2 \pm 4.7

Le condizioni sperimentali, ad eccezione del tipo di mAb usati, e il metodo di misura dell'adesione erano quelli descritti nella didascalia della Fig.11. Il controllo era rappresentato da PMN incubati con TNF in assenza di anticorpi. I dati rappresentano le medie \pm ES dei risultati di 10 esperimenti condotti in duplicato. L'analisi statistica è stata condotta mediante *test* t di Student su dati non appaiati (una coda); * = significativo con $p < 0.05$; *** = significativo con $p < 0.001$.

per volta, le altre due rimaste libere di interagire con il substrato riuscirebbero comunque a garantire alle cellule un'adesione alla FN quantitativamente invariata.

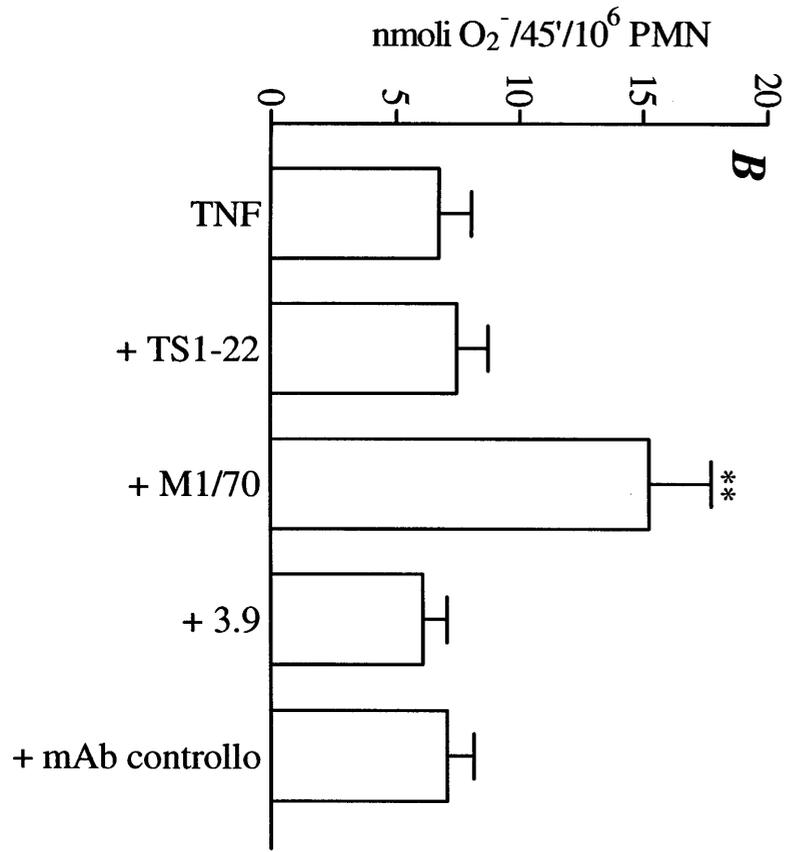
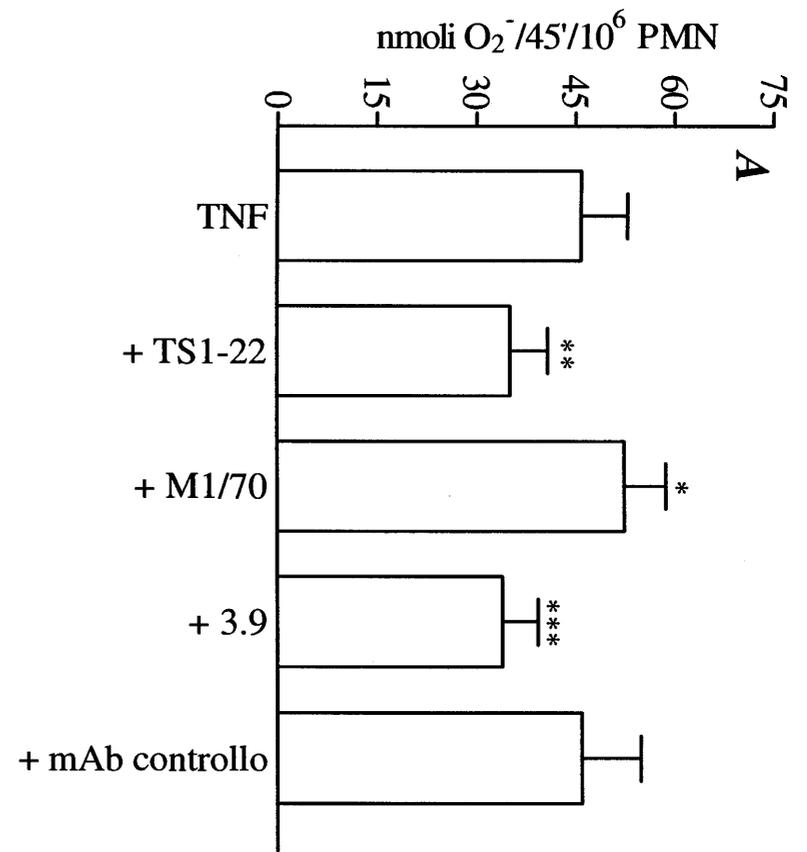
6. Metabolismo ossidativo di PMN stimolati con TNF su FN e LM: effetto di mAb anti α

Sebbene la percentuale di cellule adese a FN in presenza di TNF non venga alterata dall'aggiunta di mAb anti α al mezzo di incubazione, è plausibile che la qualità di quest'adesione sia sostanzialmente diversa da quella delle cellule di controllo, perché basata sul probabile impegno di due soli tipi di integrine β_2 alla volta. Ne troviamo conferma osservando il grafico A della *Figura 14*, in cui si riportano i risultati di esperimenti condotti per valutare l'effetto dei mAb anti α sul *burst* ossidativo indotto da TNF. Come previsto, pur lasciando inalterato il numero di cellule adese alla FN (*Tab. V*), i mAb interferiscono con la produzione di O_2^- . In particolare, gli anticorpi diretti contro α_L e α_X (rispettivamente, *TSI-22* e *3.9*) esercitano un'azione inibente e ciò suggerisce che il metabolismo indotto da TNF in PMN adesi a FN sia mediato da $\alpha_L\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$. Ma che significato attribuire ai risultati ottenuti in presenza di *M1/70* (anti α_M), che si rivela stimolatorio?

Prima di avventurarci in ipotesi azzardate circa un possibile ruolo regolatorio negativo di $\alpha_M\beta_2$, ci si è chiesti se la stimolazione del *burst* da parte di *M1/70* dipendesse semplicemente dall'interferenza della porzione Fc dell'anticorpo nel fenomeno misurato. Si sa infatti che i recettori per l'Fc delle immunoglobuline G espressi sui PMN, qualora impegnati, sono in grado di innescare la produzione di O_2^- [81, 128]; in particolare è nota la cooperazione che si può instaurare tra $\alpha_M\beta_2$ e Fc γ RIII per la successiva attivazione di Fc γ RII, l'unico capace di mediare direttamente l'attivazione metabolica [81]. L'«effetto-Fc» si farebbe quindi sentire più pesantemente nel caso del mAb anti α_M , che sarebbe in grado di innescare direttamente la cooperazione $\alpha_M\beta_2$ -Fc γ RIII facendo da ponte tra le due molecole; potrebbe però riguardare anche gli altri due mAb, il cui effetto inibitorio sul metabolismo ossidativo risulterebbe sottostimato, in quanto parzialmente mascherato da quello stimolatorio dell'Fc.

Una conferma indiretta del ruolo della porzione Fc nella produzione di O_2^- misurata in presenza dei mAb anti α viene dai risultati illustrati nel grafico B della *Figura 14*. Per completezza, parallelamente agli esperimenti di inibizione dell'adesione a LM, avevamo

Figura 14. Produzione di O_2^- da parte di PMN stimolati con TNF su FN e LM, in presenza di mAb anti catene α integriniche. Le condizioni sperimentali (salvo il tipo di mAb adoperati) e la metodica di valutazione del metabolismo ossidativo erano quelle descritte nella didascalia della Fig. 12; tutte le prove venivano parallelamente effettuate sia in pozzetti rivestiti con FN (grafico A) che con LM (grafico B). mAb di controllo: BB7.5. I dati sono le medie \pm ES dei risultati di 10 esperimenti condotti in duplicato. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il *test t* di Student su dati non appaiati (una coda); * = significativo con $p < 0.05$; ** = significativo con $p < 0.01$; *** = significativo con $p < 0.001$.



infatti voluto verificare quale fosse l'effetto dei mAb anti α sul metabolismo ossidativo, di per sé esiguo, dei PMN stimolati con TNF su questa superficie.

Come si può constatare, in presenza di *M1/70* la produzione di O_2^- su LM è notevolmente stimolata, a dispetto di una marcata inibizione dell'adesione (vedi *Tab. V*): per assurdo, i PMN aderiscono in misura minore ma respirano di più. Se osservate al microscopio ottico, le cellule su LM in presenza di *M1/70* formano evidenti aggregati, indice di un'aumentata mobilità che favorisce la possibilità d'incontro tra PMN. Il risultato finale dell'aggregazione cellulare sembra proprio l'attivazione metabolica, presumibilmente indotta dal simultaneo impegno di $\alpha_M\beta_2$ e dei recettori $Fc\gamma$; si può infatti immaginare non solo che *M1/70* medi la cooperazione tra $\alpha_M\beta_2$ e $Fc\gamma R$ presenti sulla stessa cellula, ma anche che la porzione Fc di un mAb legato ad $\alpha_M\beta_2$ su una cellula stimoli i $Fc\gamma R$ di una cellula adiacente, amplificando così il fenomeno.

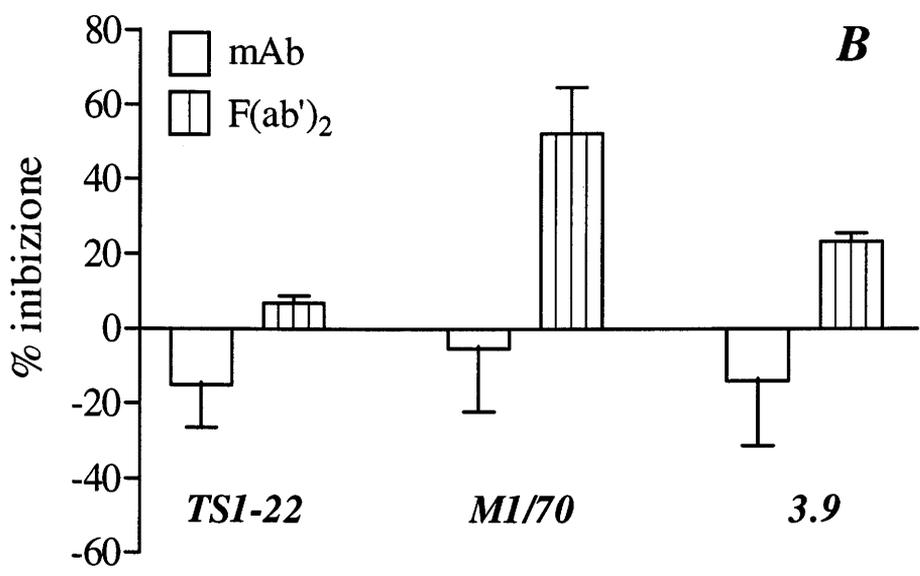
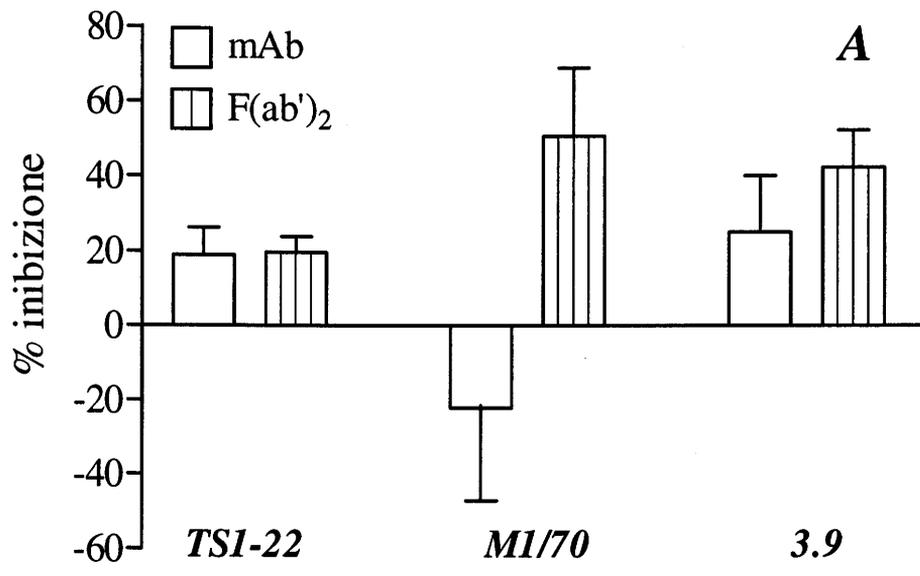
7. Confronto tra l'effetto di mAb anti α interi e dei corrispondenti frammenti $F(ab')_2$ sul metabolismo ossidativo e sull'adesione di PMN stimolati con TNF

Per confermare o escludere l'ipotesi sul contributo della porzione Fc all'effetto complessivo degli anticorpi anti α interi sui fenomeni studiati, i medesimi esperimenti di inibizione sono stati condotti utilizzando i frammenti $F(ab')_2$ ottenuti per digestione enzimatica degli stessi mAb (vedi cap. 9 della sezione MATERIALI E METODI).

Nella *Figura 15* si confronta l'effetto dei mAb utilizzati negli esperimenti precedenti con quello dei rispettivi $F(ab')_2$, sia sulla produzione di O_2^- che sull'adesione dei PMN incubati con TNF su FN. Dal grafico *A* risulta evidente che, mentre per *TS1-22* e *3.9* la presenza dell'Fc non altera in maniera significativa l'effetto inibitorio specifico di questi anticorpi sul metabolismo ossidativo (le percentuali di inibizione del mAb e del relativo $F(ab')_2$ sono paragonabili), nel caso di *M1/70* mAb e $F(ab')_2$ producono effetti addirittura opposti, segno della pesante influenza della porzione Fc dell'anti α_M nella produzione di O_2^- misurata in sua presenza; l'effetto stimolatorio aspecifico dovuto a questa parte dell'anticorpo è così forte da mascherare completamente, e anzi prevaricare, l'effettiva inibizione del metabolismo attribuibile al blocco specifico dell'integrina $\alpha_M\beta_2$.

Osservando il grafico *B* della *Fig. 15* si constata inoltre che l'adesione delle cellule a FN è suscettibile alla presenza dell'Fc, qualsiasi sia il mAb utilizzato; poiché adesione e attivazione metabolica indotte da TNF sono così strettamente correlate, bisogna ammettere

Figura 15. Inibizione del metabolismo ossidativo e dell'adesione a FN di PMN stimolati con TNF, da parte di anticorpi anti α : confronto tra mAb e relativi $F(ab')_2$. **A)** Le cellule (75×10^3 PMN/prova) venivano incubate per 45' a 37°C in pozzetti rivestiti con FN, contenenti citocromo c (c.f.: 12 mM), TNF (c.f.: 10 ng/ml) e, ove richiesto, i mAb (c.f.: 10 $\mu\text{g/ml}$) o i $F(ab')_2$ indicati (c.f.: 20 $\mu\text{g/ml}$) in 150 μl totali di HEPES•ioni. Il metabolismo ossidativo, misurato in nmoli di O_2^- prodotte, si valutava mediante letture spettrofotometriche del citocromo c ridotto (MATERIALI E METODI, cap. 4, Ia). Dai valori ottenuti in presenza dei vari mAb si calcolava infine la percentuale di inibizione rispetto alla risposta di controllo (cellule incubate con TNF senza l'aggiunta di anticorpi: 34.3 ± 3.7 nmoli $\text{O}_2^-/45'/10^6$ PMN). **B)** Le stesse cellule utilizzate nel saggio metabolico venivano sottoposte al *test* di adesione (MATERIALI E METODI, cap. 4, II, lavaggio a 200 x g) al termine dell'ultima lettura spettrofotometrica. L'effetto degli anticorpi veniva espresso come percentuale di inibizione dell'adesione di controllo (PMN incubati con il solo TNF: 69.6 ± 4.7 %). In entrambi i grafici i dati rappresentati sono le medie \pm ES dei risultati di 3 esperimenti condotti in duplicato.



che l'uso di un mAb anti α al posto del $F(ab')_2$ corrispondente altera in ogni caso il significato dei risultati ottenuti e va quindi evitato.

Focalizzando dunque l'attenzione sull'effetto dei $F(ab')_2$ anti α illustrato nella *Fig. 15A*, si potrebbe concludere che tutte e tre le integrine β_2 , seppure in diversa misura, sono coinvolte nel mediare il *burst* respiratorio TNF-dipendente dei PMN su FN. A questo punto però veniva rimesso in discussione un ipotetico ruolo di $\alpha_L\beta_2$ nell'adesione a LM; utilizzando gli anticorpi interi, infatti, avevamo potuto ipotizzare che $\alpha_L\beta_2$ non venisse coinvolta nell'interazione dei PMN con la LM (*Tab. V*) e che questo fosse il motivo della mancata risposta metabolica al TNF su questa proteina della matrice. Alla luce degli ultimi dati di inibizione dell'adesione a FN mediante i $F(ab')_2$ dei mAb anti α , dovevamo ammettere la possibilità che la mancata inibizione dell'adesione a LM da parte di *TS1-22* fosse in realtà riconducibile all'uso dell'anticorpo intero. Per escludere questa possibilità, abbiamo utilizzato i $F(ab')_2$ dei mAb anti α per inibire l'adesione TNF-dipendente dei PMN alla LM e verificare, anche mediante l'utilizzo di tali frammenti, la partecipazione delle sole α_M e $\alpha_X\beta_2$ nell'adesione a questo substrato. I risultati di questo tipo di sperimentazione sono riportati nella *Figura 16*. I dati di questa figura confermano sostanzialmente quanto già visto in adesione con i mAb interi, cioè che $\alpha_L\beta_2$ non è coinvolta nell'adesione a LM. Inoltre (vedi inserto), essi dimostrano che la porzione Fc di *M1/70* è responsabile, come supposto, della stimolazione metabolica discussa nel cap. 6.

8. Metabolismo ossidativo e adesione a FN di PMN stimolati con TNF: effetto di $F(ab')_2$ anti α singoli ed in miscela

Poiché dai dati riportati nella *Figura 15 A* emergeva il concetto che tutte e tre le integrine β_2 fossero implicate nel mediare il *burst* metabolico su FN, abbiamo voluto approfondire lo studio sul contributo di ciascuna integrina β_2 all'attivazione metabolica da TNF. Per farlo ci siamo serviti dei $F(ab')_2$ anti α , sia aggiungendoli singolarmente al mezzo di incubazione delle cellule (come già fatto, anche se in un numero limitato di esperimenti), sia combinandoli a due a due in miscele per lasciar interagire con la FN un solo tipo di integrina alla volta.

I risultati ottenuti sono espressi nel grafico *A* della *Figura 17*. Si osserva innanzitutto che gli effetti inibitori di *TS1-22*, *M1/70* e *3.9* usati singolarmente (già evidenziati nella *Figura 15 A*) risultano significativi su un numero maggiore di esperimenti ed indicano

Figura 16. Confronto tra l'effetto di mAb anti α e quello dei relativi $F(ab')_2$ sull'adesione a LM di PMN stimolati con TNF. Le cellule venivano incubate in pozzetti rivestiti con LM; per il resto le condizioni sperimentali ed i metodi di valutazione dell'adesione e del metabolismo ossidativo erano come quelli relativi alla Fig. 15. Il grafico illustra l'effetto dei diversi anticorpi sull'adesione indotta da TNF (27.4 % di PMN adesi), espresso come percentuale di inibizione. Nell'inserto si mostra come varia la produzione di O_2^- delle cellule incubate con TNF a seconda che al mezzo si aggiungano M1/70 mAb intero o il corrispondente $F(ab')_2$. I dati si riferiscono ad un esperimento condotto in duplicato.

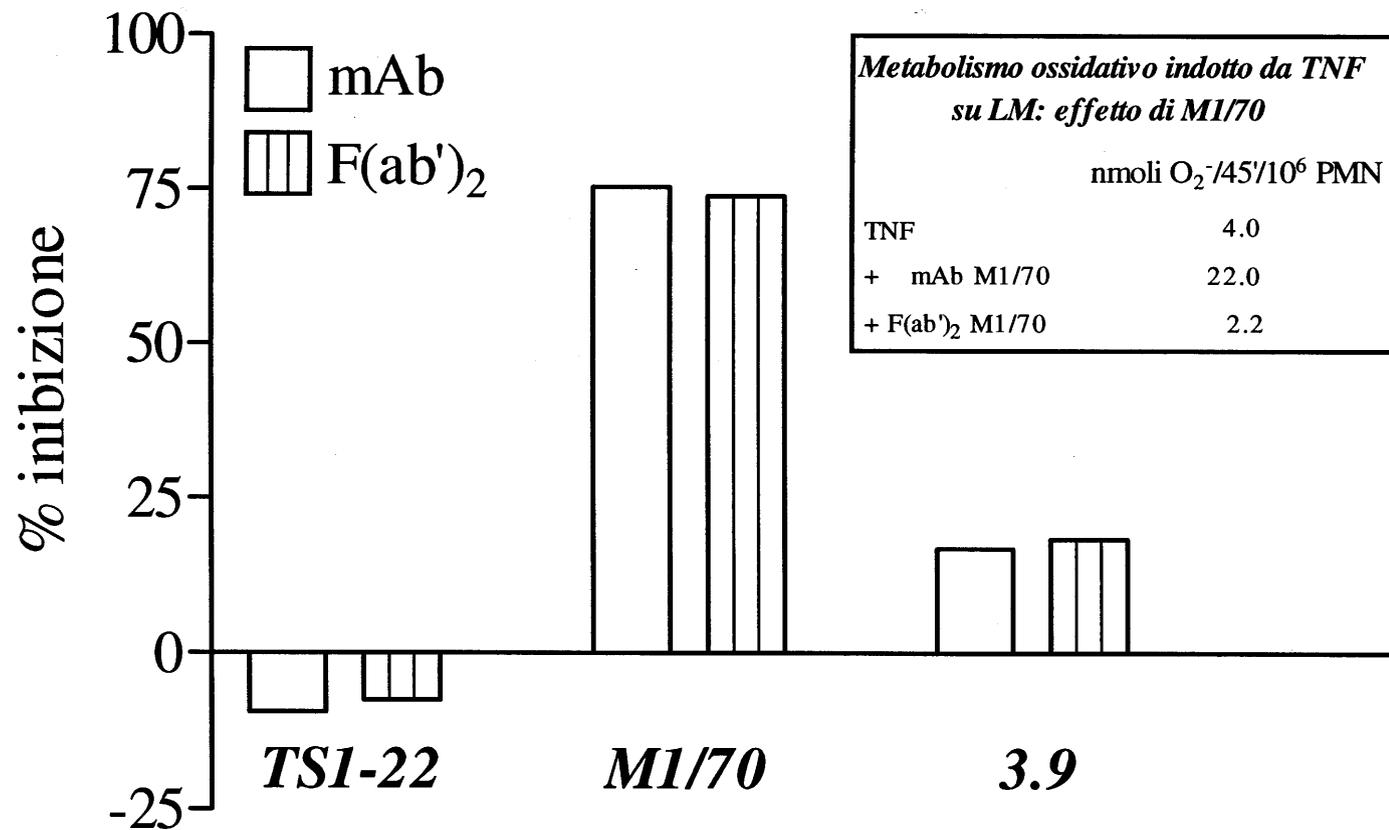
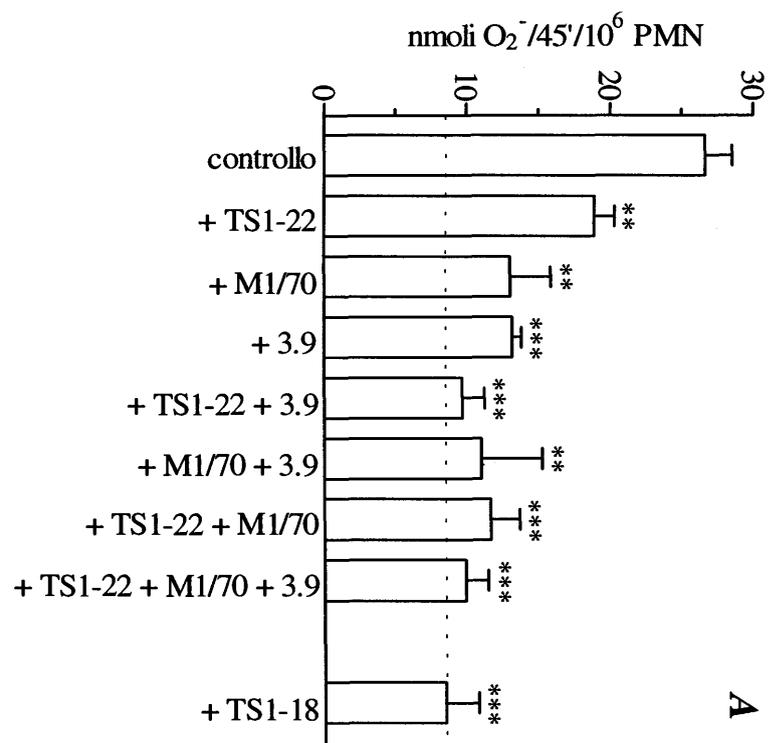
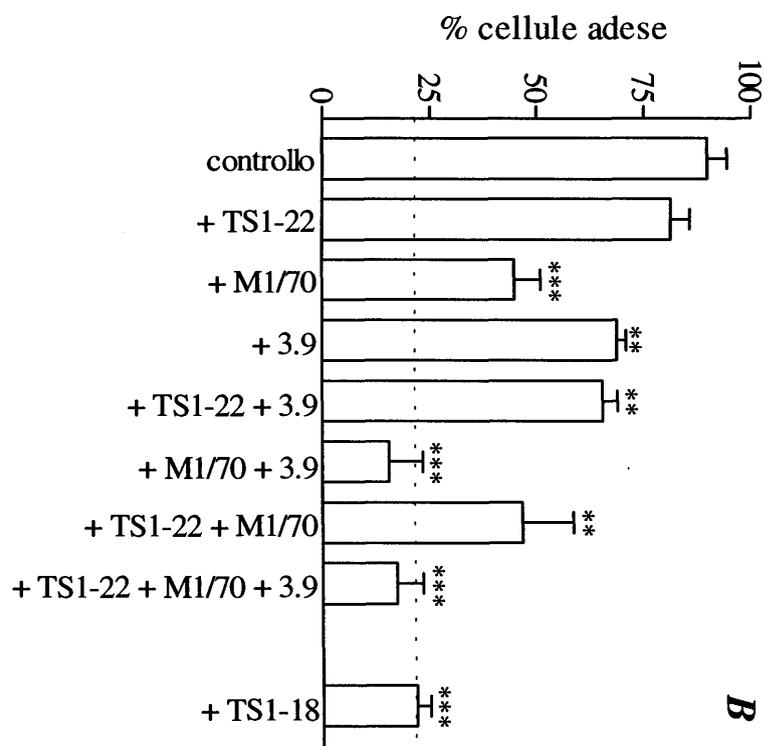


Figura 17. Effetto di $F(ab')_2$ anti α sulla risposta metabolica e sull'adesione a FN di PMN stimolati con TNF. **A)** Le condizioni sperimentali e la metodica di valutazione del metabolismo ossidativo erano come descritto nella *Fig 15 A*. La concentrazione finale del $F(ab')_2$ TSI/18 era di 40 $\mu\text{g/ml}$. **B)** Il saggio di adesione si effettuava come descritto in *Fig. 15 B*. Sia nel grafico **A** che nel **B**, i dati rappresentati sono le medie \pm ES dei risultati di 5 esperimenti condotti in duplicato. L'analisi statistica è stata eseguita mediante *test t* di Student su dati non appaiati (una coda), confrontando i valori ottenuti in presenza dei $F(ab')_2$ con quelli di controllo (cellule incubate con il solo TNF). Per i livelli di significatività resta valida la simbologia descritta nella didascalia della *Fig 14*.



$\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$ come le molecole più pesantemente coinvolte nella produzione di O_2^- . Osservando la seconda parte del grafico si constata poi che, utilizzando i medesimi $F(ab')_2$ in miscela, qualsiasi abbinamento ha l'efficacia inibitoria dell'anti β_2 (*TS1-18*) o della miscela dei tre anti α : l'abbattimento del *burst* è pressochè totale. Se da un lato questo non aggiunge alcuna informazione utile per discriminare tra contributo di $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$ nella risposta metabolica, dall'altro suggerisce la necessità della co-partecipazione di almeno due tipi di integrine β_2 nell'interazione con la FN affinché si possa registrare una qualche produzione di O_2^- .

Il grafico *B* della *Figura 17* mostra come venga parallelamente alterata l'adesione cellulare nelle medesime condizioni sperimentali relative ad *A*. E' importante notare che l'esigua inibizione dell'adesione da *TS1-22* riportata nella *Figura 15 B* risulta non significativa su un numero maggiore di esperimenti, mentre è confermata per $\alpha_X\beta_2$ e soprattutto per $\alpha_M\beta_2$ la responsabilità dell'ancoraggio dei PMN alla FN. Interagendo con il substrato $\alpha_L\beta_2$, pur non essendo importante nel garantire l'adesione cellulare, avrebbe dunque un ruolo attivo nell'induzione del *burst* ossidativo da TNF. La parte del grafico dedicata ai risultati ottenuti con le miscele di $F(ab')_2$ conferma l'assenza di un ruolo proadesivo per $\alpha_L\beta_2$; infatti, la co-presenza di *TS1-22* non ha alcuna influenza sull'effetto inibitorio individuale degli altri due anticorpi; si può notare invece come l'interdizione contemporanea di $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$ annulla totalmente l'adesione a FN indotta da TNF, riportandola ai livelli osservati in presenza dell'anti β_2 .

9. Valutazione diretta della capacità delle integrine β_2 di trasdurre un segnale per l'attivazione metabolica: messa a punto del modello sperimentale

Considerando l'assoluta dipendenza del *burst* respiratorio indotto da TNF su FN da un'adesione β_2 -mediata, ci siamo chiesti come si collocava il ruolo di ogni singola integrina β_2 in questo doppio fenomeno; si trattava cioè di chiarire, per ciascuna di esse, se fossero direttamente in grado di mediare la generazione di O_2^- o se il loro contributo alla risposta metabolica dipendesse semplicemente dalla capacità di far aderire le cellule al substrato. Per $\alpha_L\beta_2$ il dilemma era di fatto inesistente, essendo questa molecola in apparenza estranea all'aggancio dei PMN alla FN; nel caso di $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$ rimaneva invece l'ambiguità del doppio ruolo, metabolico e adesivo, che necessitava ulteriori approfondimenti.

Per avere una prova diretta della capacità o meno delle singole integrine β_2 di inviare alla cellula stimolata dal TNF un segnale di attivazione metabolica, abbiamo pensato di adottare un modello sperimentale che ci permettesse di «catturare» i PMN attraverso l'impegno selettivo di un solo tipo di integrina alla volta, escludendo simultaneamente il coinvolgimento delle altre due. Questo scopo era raggiungibile utilizzando superfici rivestite con mAb anti α (vedi MATERIALI E METODI, cap. 2c), che avrebbero garantito uno stabile *crosslinking* dell'integrina di interesse. Esperimenti preliminari di *crosslinking* di integrine β_2 mediante anticorpi solubili su PMN stimolati con TNF in sospensione [129], avevano avuto esiti del tutto negativi, indicando che i neutrofilo necessitano di un ligando in fase fissa per andare incontro ad una attivazione metabolica evidenziabile con i nostri sistemi di rilevamento. L'uso di anticorpi immobilizzati sulla piastra di saggio comportava tuttavia un inconveniente nient'affatto trascurabile: i PMN stimolati con TNF acquisiscono una grande potenzialità adesiva e, se mantenuti su una superficie proteica in condizioni ioniche fisiologiche, tendono ad attaccarsi al substrato indipendentemente dalla specificità del mAb sottostante (dati non mostrati). Pertanto, prima di poter sfruttare con successo un simile approccio sperimentale, che ci avrebbe consentito di impegnare le cellule solo mediante il riconoscimento specifico antigene (integrina)-anticorpo, dovevamo neutralizzare la propensione dei neutrofilo incubati con TNF ad aderire.

Lo scopo è stato raggiunto omettendo dal mezzo di incubazione il Ca^{2+} e il Mg^{2+} che, com'è noto, regolano finemente la funzionalità delle integrine β_2 interagendo con specifici siti di legame nella porzione extracellulare di queste molecole (vedi INTRODUZIONE, cap. 5). La condizione sperimentale «assenza di ioni» era garantita inoltre dall'aggiunta di EDTA 1 mM al mezzo di incubazione, strategia ampiamente applicata in letteratura ed indispensabile per eliminare qualsiasi traccia di $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ eventualmente presente negli altri reagenti adoperati o dovuta a possibili flussi ionici dall'interno all'esterno delle cellule.

Nella *Tabella VI* si può osservare che in un mezzo di incubazione privo di $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ i PMN stimolati con TNF non sono più in grado di aderire alla FN e, di conseguenza, diventano incapaci di produrre O_2^- . Nel modello dei mAb immobilizzati il ricorso ad un tampone privo di tali ioni permetteva quindi di impegnare in modo diretto e specifico un tipo di integrina β_2 per volta, escludendo qualsiasi altra interazione tra gli altri due tipi di integrine leucocitarie ed il substrato, sia esso rappresentato dalla FN saturante o dagli stessi mAb in quanto proteine.

Tabella VI. Dipendenza dai cationi divalenti dell'adesione e della produzione di O₂ di PMN stimolati con TNF su FN

condizioni	% cellule adese	nmoli O₂/45'/10⁶ PMN
PMN in HEPES•ioni	77.4 ± 12.9	38.7 ± 8.5
PMN in HEPES•EDTA	2.5 ± 1.2	1.0 ± 0.8

Le cellule (50 µl/prova di una popolazione a 1.5 x 10⁶ PMN in HEPES•ioni o HEPES•EDTA) venivano incubate per 45' a 37°C in pozzetti rivestiti con FN, contenenti citocromo c (c.f.: 12 mM) e TNF (c.f.:10 ng/ml) in 150 µl totali di HEPES•ioni o HEPES•EDTA. La produzione di O₂⁻ si misurava come descritto in MATERIALI E METODI», cap. 4, Ia. Al termine dell'incubazione, si valutava l'adesione delle cellule al substrato (MATERIALI E METODI, cap. 4, II, lavaggio a 200 x g). I dati sono le medie ± ES dei risultati di 3 esperimenti condotti in duplicato.

10. Effetto del *crosslinking* di integrine β_2 da parte di mAb immobilizzati alla plastica sul metabolismo ossidativo di PMN stimolati con TNF

Scelta quindi come ottimale la condizione sperimentale «assenza di $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ », abbiamo valutato l'effetto del coinvolgimento selettivo di ogni integrina β_2 sulla produzione di O_2^- di PMN incubati con TNF, utilizzando superfici rivestite con gli stessi anticorpi anti α che si erano dimostrati capaci di inibire il *burst* metabolico dei PMN sulla FN (vedi *Fig. 15A*). Ciò ci poneva al riparo da eventuali dubbi sull'efficacia dei mAb, qualora il *crosslinking* di questa o quella integrina non avesse determinato una produzione di O_2^- .

I risultati ottenuti in questa prima serie di prove sono rappresentati nel grafico della *Figura 18*. Appare evidente che solo sulle superfici rivestite con mAb anti β_2 e anti α_L (*TS1-18* e *TS1-22*, rispettivamente), ma non con anti α_M o anti α_X , si registra un'attività metabolica significativamente maggiore di quella sul mAb di controllo (*BB7.5*). Ciò non è imputabile ad una differenza nell'adsorbimento dei diversi mAb in quanto, come indicato nell'inserito del medesimo grafico, il legame dei vari anticorpi alla plastica era paragonabile.

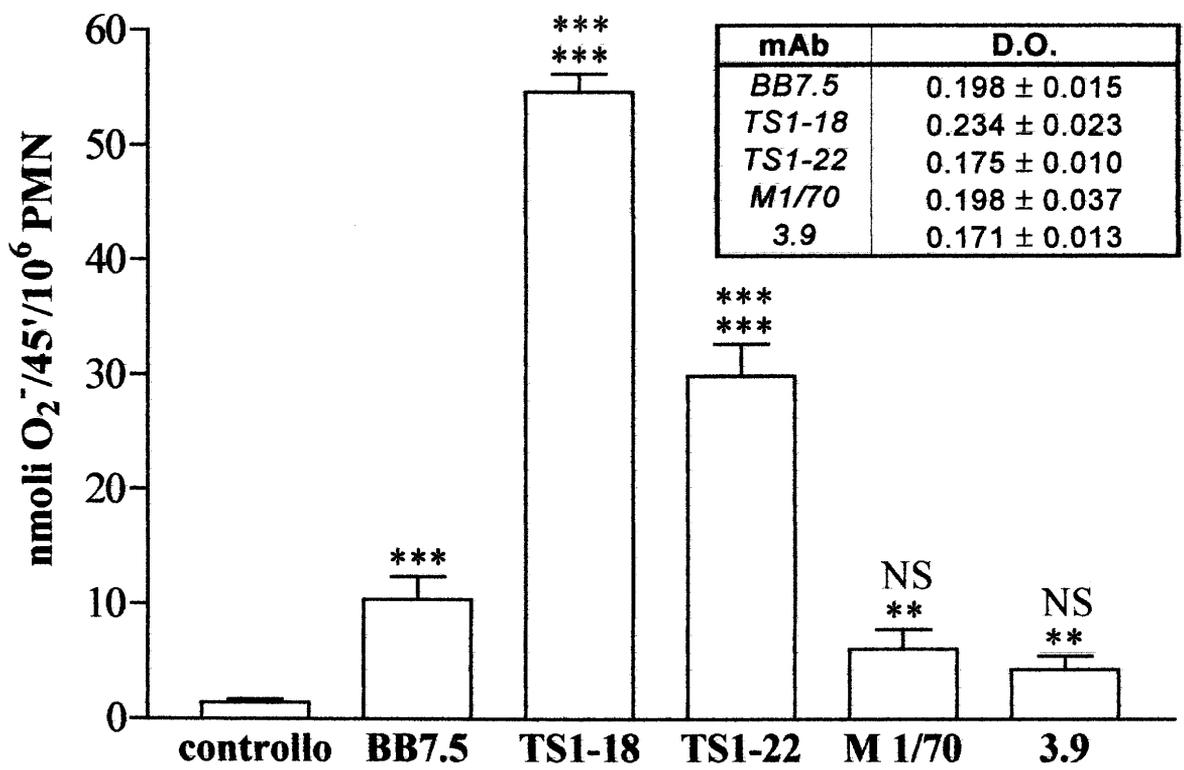
Sebbene questi dati siano già di per sé indicativi di una abilità segnalatoria diretta della sola $\alpha_L\beta_2$, non si può tuttavia ignorare che su tutti i mAb, compreso *BB7.5* (anticorpo di controllo), la produzione di O_2^- era significativamente diversa da quella delle cellule incubate con TNF in pozzetti rivestiti con la sola FN (*controllo*). Questa evidenza poteva essere segno di una attivazione cellulare aspecifica dovuta forse, anche in questo caso, all'interferenza della porzione Fc degli anticorpi usati; in quest'ottica avrebbe inoltre trovato spiegazione la sorprendente entità di risposta su *TS1-18*, superiore addirittura alla produzione di O_2^- indotta da TNF in condizioni ioniche normali.

11. Metabolismo ossidativo di PMN stimolati con TNF su anticorpi immobilizzati al supporto in modo da escludere l'interferenza della porzione Fc

a) Legame dei mAb alla proteina G

Per eliminare l'eventuale contributo dei recettori $\text{Fc}\gamma\text{RII}/\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ alla produzione di O_2^- , l'immobilizzazione dei mAb è stata realizzata non più tramite adsorbimento su plastica, ma mediante legame di affinità a superfici covalentemente rivestite con proteina G. Poiché la proteina G riconosce proprio la regione Fc dei mAb, questa veniva automaticamente esclusa dall'interazione con i PMN, perdendo così qualsiasi eventuale attività stimolatoria.

Figura 18. Metabolismo ossidativo di PMN stimolati con TNF su superfici rivestite con anticorpi monoclonali anti integrine. Le cellule, risospese in HEPES•EDTA, venivano incubate per 45' a 37°C in pozzetti rivestiti con i mAb indicati (MATERIALI E METODI, cap. 2 c) e contenenti, in 150 µl totali di HEPES•EDTA, TNF a 10 ng/ml e citocromo c 12 mM. Il metabolismo ossidativo si valutava come spiegato al cap.4, 1a della sezione MATERIALI E METODI. Nel grafico sono rappresentate le medie ± ES dei risultati di 10 esperimenti condotti in duplicato. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il *test t* di Student su dati non appaiati (una coda). I valori ottenuti sui diversi mAb sono stati confrontati sia con la risposta di controllo (PMN incubati con TNF in pozzetti non rivestiti con alcun anticorpo), sia con la produzione di O₂⁻ registrata su BB7.5 (mAb di controllo). I livelli di significatività, espressi con la simbologia già adottata nelle figure precedenti, sono indicati, rispettivamente, in nero e in blu. Nell'inserto si mostra l'adsorbimento dei diversi mAb alla plastica che è stata misurato, esperimento per esperimento, mediante *test* ELISA (MATERIALI E METODI, cap. 3) ed è quindi espresso in valori di densità ottica (D.O.).



Come dimostra il grafico della *Figura 19*, questa strategia metodologica riporta a valori di controllo la produzione di O_2^- su *BB7.5* e riduce notevolmente, mantenendola comunque significativa, quella su *TS1-18* e *TS1-22*, prova del fatto che i risultati precedenti erano «gonfiati» dall'attivazione metabolica Fc-mediata, pur non essendo qualitativamente diversi.

Può forse sembrare strano che la risposta dei PMN su *TS1-22* sia apprezzabilmente superiore a quella misurata su *TS1-18*; se esiste pur sempre la possibilità che l'anti β_2 legha le integrine con minor efficienza rispetto all'anti α_L , la spiegazione più convincente di questa differenza è che, mentre *TS1-22* «cattura» selettivamente le sole molecole $\alpha_L\beta_2$, *TS1-18*, essendo diretto contro tutte e tre le integrine leucocitarie, risulta impegnato anche nel legame di quelle rivelatesi non responsive. Anche in questa seconda serie di esperimenti non si registra infatti alcuna attività metabolica in associazione al *crosslinking* di $\alpha_M\beta_2^*$ e $\alpha_X\beta_2$, nonostante l'entità di legame alla proteina G sia confrontabile per tutti i mAb (vedi inserto della *Figura 19*).

b) Immobilizzazione dei frammenti F(ab')₂

Per essere sicuri al di là di ogni ragionevole dubbio che la produzione di O_2^- ottenuta su *TS1-18* e *TS1-22* fosse specifica e non un artefatto, abbiamo condotto alcuni esperimenti riprendendo il modello sperimentale degli anticorpi adsorbiti alla plastica, ma utilizzando questa volta non più i mAb interi bensì i relativi frammenti F(ab')₂, già sfruttati efficacemente negli esperimenti di inibizione; tale approccio permetteva di escludere a monte ogni possibile interferenza della porzione Fc delle molecole anticorpali.

I risultati sono illustrati nel grafico della *Figura 20*, dove si constata non solo l'effettiva induzione della risposta metabolica su *TS1-18* e *TS1-22*, ma trova definitiva verifica la specificità stessa di tale risposta (vedi inserto): la produzione di O_2^- indotta da TNF sui F(ab')₂ è inibita in maniera massiccia dagli stessi anticorpi aggiunti in sospensione, ma non viene intaccata dall'anticorpo di controllo.

Il fatto che le risposte ossidative registrate sui F(ab')₂ siano mediamente più basse di quelle associate ai mAb interi su proteina G non è imputabile ad un inferiore legame dei F(ab')₂ alla superficie dei pozzetti; il rivestimento della plastica era infatti omogeneo per tutti e tre i F(ab')₂ considerati (*BB7.5*: D.O. = 0.152 ± 0.019 ; *TS1/18*: D.O. = $0.130 \pm$

* Si è dimostrato incapace di indurre produzione di O_2^- anche *MY/904*, anticorpo anti α_M che lega un epitopo diverso da quello riconosciuto da *M1/70* (vedi *Tab. II* a pag. 20). Ciò rafforza l'idea che $\alpha_M\beta_2$ sia priva di attività segnalatoria ai fini del *burst*, indipendentemente dal sito di sollecitazione.

Figura 19. Produzione di O_2^- indotta da TNF in PMN a contatto con mAb anti integrine immobilizzati su proteina G. Il rivestimento dei pozzetti con proteina G e successiva immobilizzazione dei mAb indicati si effettuava come descritto in dettaglio nel cap. 2, e) della sezione MATERIALI E METODI. Le altre condizioni sperimentali e la valutazione del metabolismo ossidativo erano uguali a quelle relative alla Fig. 19. Nel grafico sono rappresentate le medie \pm ES di 9 esperimenti condotti in duplicato. L'analisi statistica, effettuata mediante *test t* di Student su dati non appaiati (una coda), si basava sul confronto tra produzione di O_2^- delle cellule incubate sui vari mAb anti integrine e quella dei PMN a contatto con il mAb di controllo (BB7.5). Il riquadro raccoglie i dati relativi all'entità di legame dei diversi mAb alla proteina G; si tratta delle medie \pm ES dei risultati di *test ELISA* allestiti parallelamente ai saggi metabolici di cui sopra.

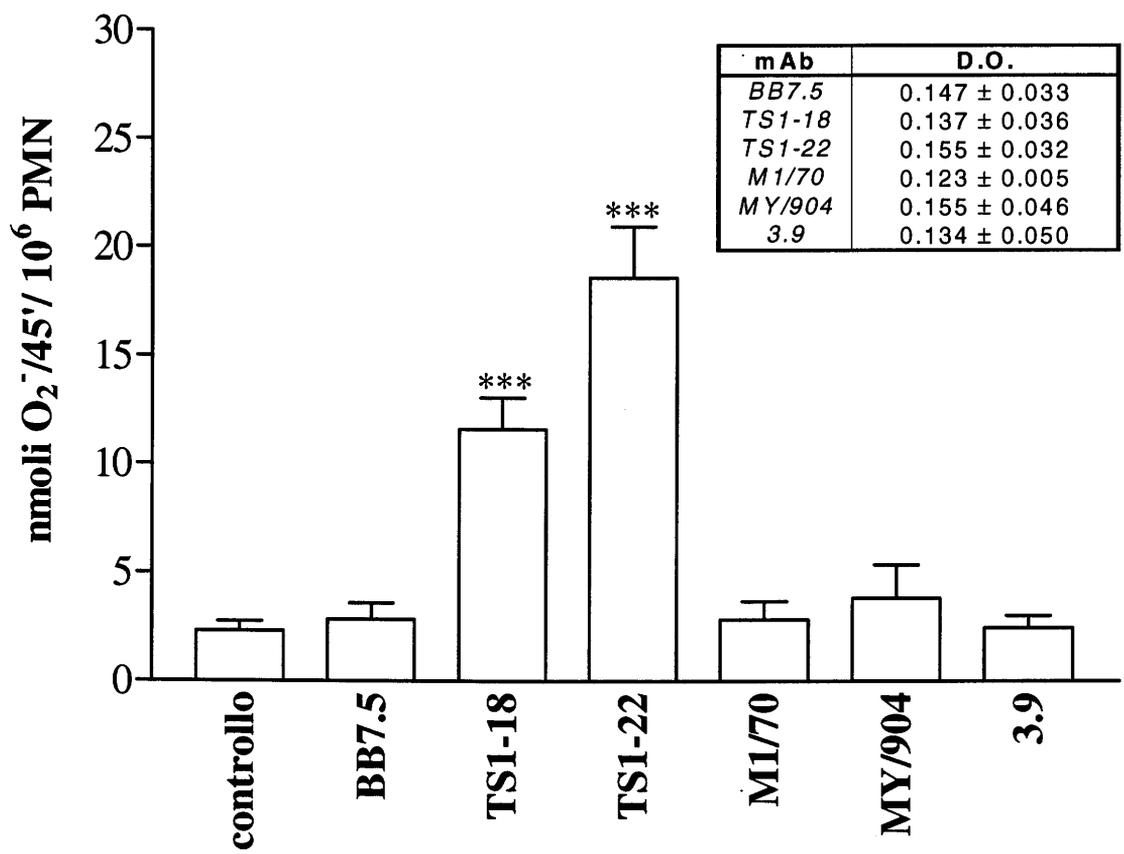
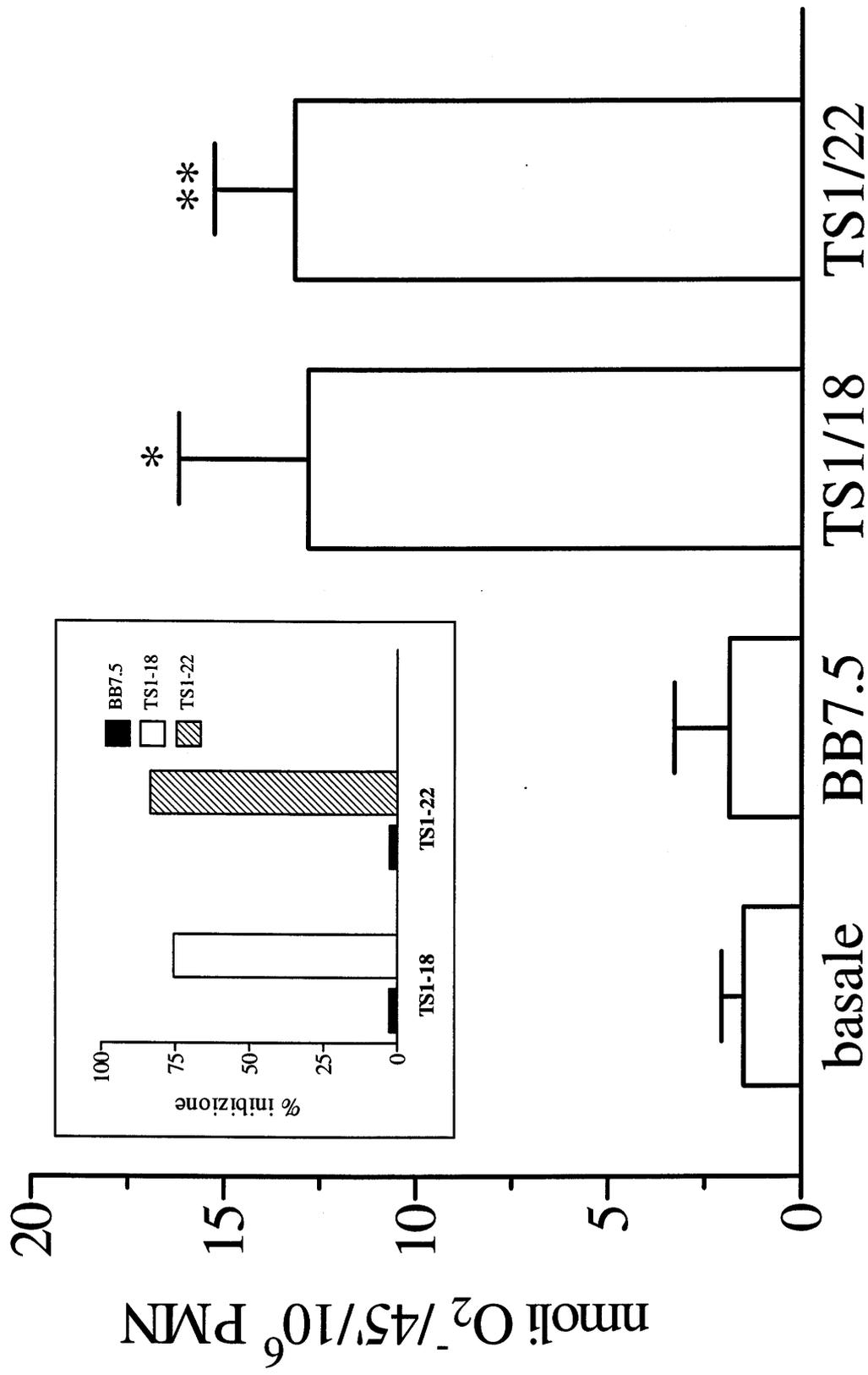


Figura 20. Metabolismo ossidativo di PMN incubati con TNF su superfici rivestite con $F(ab')_2$ anti integrine. Il rivestimento dei pozzetti si realizzava per adsorbimento dei $F(ab')_2$ indicati alla plastica (MATERIALI E METODI, cap. 2 d). Per il resto, le condizioni sperimentali e la valutazione del metabolismo ossidativo erano le stesse della Fig. 19. I dati raffigurati nel grafico sono le medie \pm ES dei risultati di 6 esperimenti condotti in duplicato. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il *test t* di Student su dati non appaiati (una coda); i livelli di significatività, indicati con la simbologia già adottata nelle figure precedenti, si riferiscono al confronto tra la produzione di O_2^- ottenuta sui $F(ab')_2$ anti β_2 (TS1/18) e anti α_L (TS1/22), e quella delle cellule incubate sul $F(ab')_2$ di controllo (BB7.5). Nell'insero sono rappresentati i risultati di un esperimento condotto in duplicato, in cui alle cellule incubate con TNF sui $F(ab')_2$ TS1/18 e TS1/22, venivano aggiunti in sospensione i mAb indicati (c.f.: 10 μ g/ml). L'effetto di tali mAb è espresso come percentuale di inibizione rispetto alla risposta di controllo (PMN incubati con TNF sui $F(ab')_2$ senza l'aggiunta di mAb in sospensione: 17.6 nmoli $O_2^-/45'/10^6$ PMN su TS1/18; 19.4 nmoli $O_2^-/45'/10^6$ PMN su TS1/22).



0.071; TSI/22: D.O. = 0.143 ± 0.013 . Medie \pm ES di 3 *test* ELISA) e paragonabile a quello ottenuto utilizzando i rispettivi mAb (vedi inserto della Fig. 18). Si deve però considerare che, mentre è possibile ottimizzare l'orientamento dei mAb interi per mezzo della proteina G, quello dei F(ab')₂ adsorbiti alla plastica è assolutamente incontrollabile ed è quindi logico aspettarsi che una superficie così rivestita offra complessivamente alla cellula un numero inferiore di siti di attacco per le integrine.

12. Riconoscimento delle integrine da parte di mAb anti α : effetto dell'EDTA

Gli esperimenti su anticorpi immobilizzati avevano dunque dimostrato la capacità intrinseca di $\alpha_L\beta_2$ di inviare alla cellula il segnale per il *burst* indotto da TNF, mentre sembravano escludere un simile ruolo per le altre due integrine. L'assenza di risposta metabolica in seguito al *crosslinking* di $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$ avrebbe potuto avere, tuttavia, una diversa giustificazione. Considerata l'importanza dei cationi divalenti nel modulare la struttura integrinica, era possibile che la presenza dell'EDTA nel mezzo di incubazione delle cellule compromettesse il riconoscimento anticorpale da parte di M1/70 e 3.9. Si è deciso pertanto di verificare l'entità di legame dei mAb anti α ai PMN in HEPES•EDTA con le tecniche citofluorimetriche sfruttate nella valutazione dell'espressione delle integrine (MATERIALI E METODI, cap. 7).

Effettivamente, dalla *Tabella VII* risulta chiaro che l'aggiunta dell'EDTA nel medium provoca una sensibile diminuzione dell'efficacia di riconoscimento da parte dei mAb utilizzati; tale fenomeno potrebbe essere:

- a) imputabile all'attività chelante dell'EDTA che sottrae $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ alle integrine, provocandone in qualche modo un'alterazione conformazionale o comunque impedendo il corretto riconoscimento da parte del mAb [34];
- b) causato da un'interferenza diretta della molecola di EDTA sulla struttura integrinica; esso si legherebbe proprio al sito legante i cationi [130] che potrebbe coincidere o essere molto prossimo alla regione riconosciuta dagli anticorpi.

La *Tabella VII* mostra che la riduzione del legame dei mAb ai PMN è di entità paragonabile per tutti gli anticorpi utilizzati; non si può però ignorare che, per un'integrina abbondantemente espressa sulla membrana plasmatica come $\alpha_M\beta_2$, un calo dell'efficienza di legame anticorpale potrebbe essere irrilevante, mentre nel caso di una molecola già di per sé scarsamente rappresentata come $\alpha_X\beta_2$, una riduzione della capacità di legame potrebbe avere conseguenze nient'affatto trascurabili.

Tabella VII. Effetto dell'EDTA 1 mM sul legame dei mAb anti integrine ai PMN

mAb	% di inibizione
<i>TS1-18</i>	39.3 ± 2.3
<i>TS1-22</i>	28.7 ± 10.5
<i>M1/70</i>	28.4 ± 4.9
<i>3.9</i>	51.7 ± 4.9
<i>BB7.5</i>	17.5 ± 1.2

Le cellule (1.5×10^6 PMN/ml in HEPES•ioni o HEPES•EDTA) venivano incubate con TNF (c.f.: 10 ng/ml) per 20' a 37°C, in sospensione. Per il resto la procedura sperimentale e l'analisi citofluorimetrica erano come descritto nella didascalia della *Fig. 10*. L'effetto dell'EDTA sul legame di ciascun mAb alle cellule veniva espresso come percentuale di inibizione rispetto all'immunofluorescenza della popolazione di controllo (PMN trattati con lo stesso mAb, in HEPES•ioni). I dati sono la media ± ES dei risultati di 4 esperimenti.

Il riscontro funzionale più immediato dell'efficienza di legame mAb-integrine è rappresentato, nel nostro modello sperimentale, dal grado di «cattura» delle cellule da parte degli anticorpi immobilizzati (*Fig. 21*), misurabile con lo stesso metodo applicato per la valutazione dell'adesione (MATERIALI E METODI, cap.4, II). Poiché non si poteva prescindere dall'uso dell'EDTA ed era nel contempo necessario tener conto di come esso sfavorisca, in misura diversa per ogni mAb, l'aggancio dei PMN alla superficie, abbiamo pensato di correggere ogni valore relativo alla produzione di O_2^- in funzione del grado di «cattura» cellulare.

13. Produzione di O_2^- in PMN stimolati con TNF su mAb anti integrine β_2 : normalizzazione per il numero di cellule «catturate»

Nella *Figura 22* viene proposta una normalizzazione dei dati relativi alla produzione di O_2^- in base alla quantità di cellule «catturate» dagli anticorpi. Anche il grafico di questa figura parla chiaramente a sfavore di $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$ come molecole trasduttrici il segnale per il *burst*; inoltre, riproponendo quanto già visto per *TS1-18* e per *TS1-22*, avvalora l'esclusività del ruolo diretto di $\alpha_L\beta_2$ nell'attivazione respiratoria indotta da TNF, da due punti di vista:

1. la risposta su *TS1-18* non è superiore a quella su *TS1-22*, il che fa ragionevolmente supporre che nella produzione di O_2^- non siano implicate altre integrine leucocitarie al di fuori di $\alpha_L\beta_2$;
2. la risposta su *TS1-22* (pari a circa 25 nmoli $O_2^-/45'/10^6$ PMN) non è troppo dissimile da quella indotta da TNF in condizioni fisiologiche, soprattutto se si tien conto del fatto che i PMN in assenza di Ca^{2+}/Mg^{2+} non si trovano certo nelle condizioni migliori per una attivazione metabolica ottimale.

14. Ruolo del TNF nella capacità di $\alpha_L\beta_2$ di generare un segnale di attivazione metabolica

Grazie al modello sperimentale dei mAb in fase fissa abbiamo quindi potuto stabilire che, delle tre integrine β_2 rappresentate sulla superficie dei PMN, solo $\alpha_L\beta_2$ è in grado di inviare direttamente alla cellula il segnale per l'attivazione metabolica.

Poiché è stato dimostrato (vedi cap. 8) che in condizioni fisiologiche $\alpha_L\beta_2$, pur impegnata nel riconoscimento della FN, non è capace di garantire l'adesione dei PMN,

Figura 21. Cattura di PMN stimolati con TNF da parte di mAb anti integrine immobilizzati su proteina G. Le cellule (75×10^3 PMN/prova in HEPES•EDTA) venivano incubate con TNF (c.f.: 10 ng/ml) in pozzetti rivestiti con i mAb indicati mediante legame a proteina G (MATERIALI E METODI, cap. 2 e). Dopo 45' a 37°C, i pozzetti venivano lavati con PBS (5' a 200 x g) e la percentuale di cellule rimaste attaccate alle superfici si valutava come descritto in MATERIALI E METODI, cap. 4, II. I dati rappresentano le medie \pm ES dei risultati di 7 esperimenti condotti in duplicato.

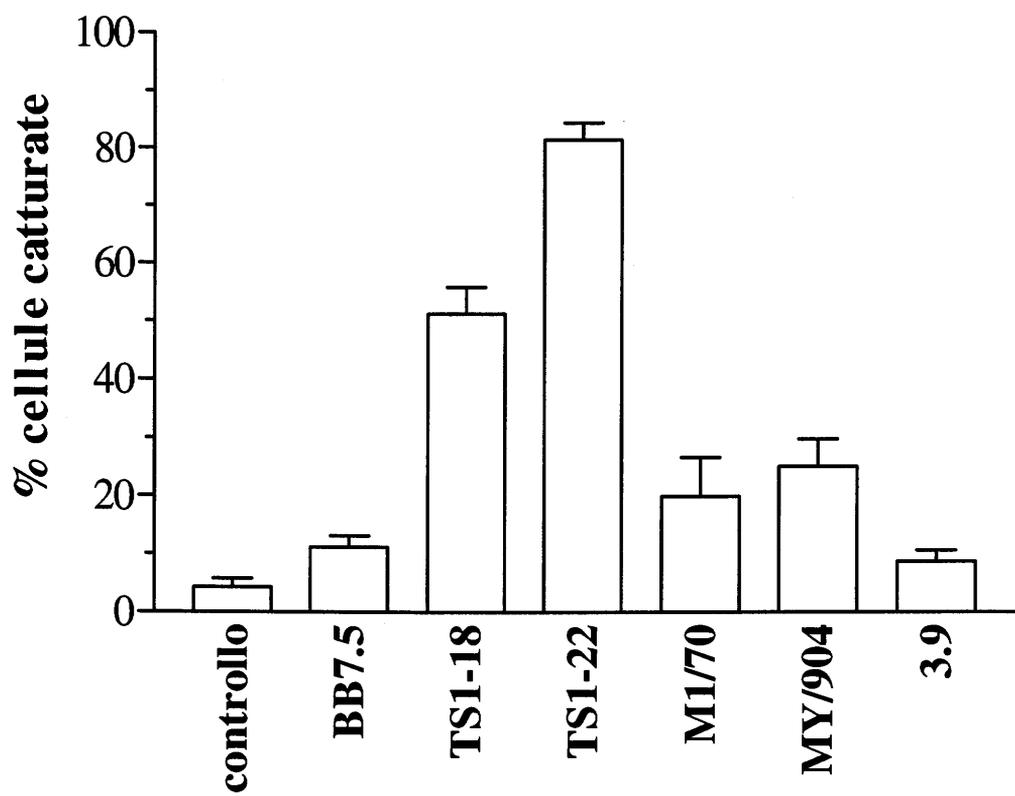
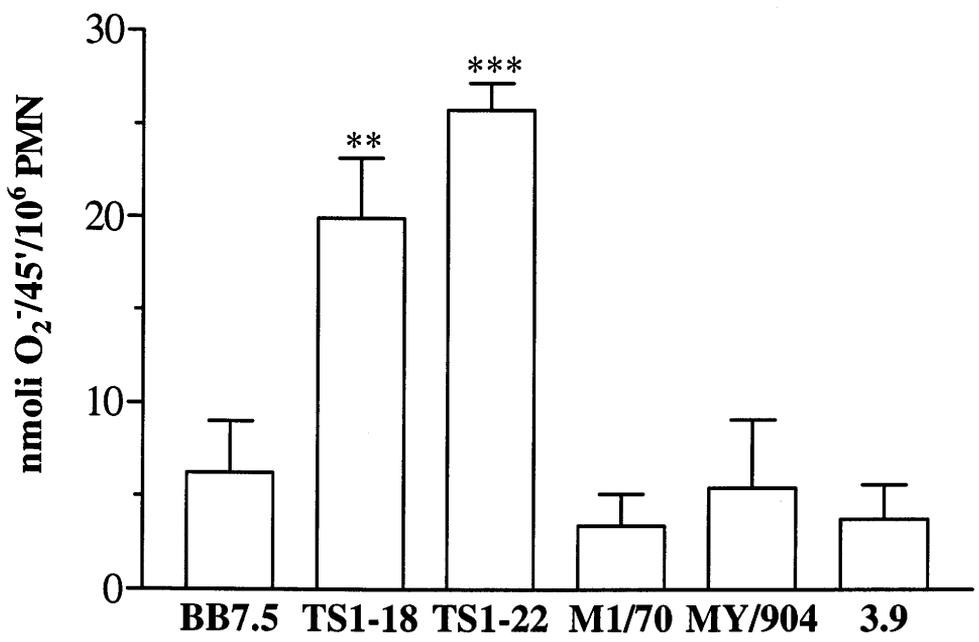


Figura 22. Produzione di O_2^- da parte di PMN stimolati con TNF su mAb anti integrine immobilizzati: normalizzazione per il numero di cellule catturate. I mAb indicati venivano immobilizzati su superfici rivestite con proteina G (MATERIALI E METODI, cap. 2 e). Per tutte le altre condizioni sperimentali e per la valutazione del metabolismo ossidativo, vedere la didascalia della Fig. 19. Al termine del saggio metabolico si determinava la percentuale di cellule catturate da ciascun mAb come descritto per la Fig. 21. Infine, i valori di O_2^- misurati in ogni prova venivano rapportati al corrispondente grado di cattura cellulare secondo la proporzione:
$$\text{nmoli } O_2^- / 45 \times 10^6 \text{ PMN effettive} : \% \text{ cattura effettiva} = x : 100 \% \text{ cattura}$$
dove x rappresenta la produzione di O_2^- normalizzata. Nel grafico sono riportate le medie \pm ES dei risultati di 6 esperimenti condotti in duplicato. I dati ottenuti sui mAb anti integrine sono stati analizzati statisticamente confrontandoli con i valori relativi al mAb di controllo (BB7.5) (test t di Student su dati non appaiati, due code). ** = significativo con $p < 0.01$; *** = significativo con $p < 0.001$.



appare verosimile che $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$ rivestano il ruolo di mediare un efficiente contatto dei neutrofili con il substrato (*spreading?*) che favorirebbe l'interazione tra quest'ultimo e l'unica integrina segnalatrice. Questa funzione ancillare verrebbe meno nella condizione sperimentale «assenza di Ca^{2+}/Mg^{2+} », che annulla di fatto qualsiasi riconoscimento attivo del substrato da parte delle integrine.

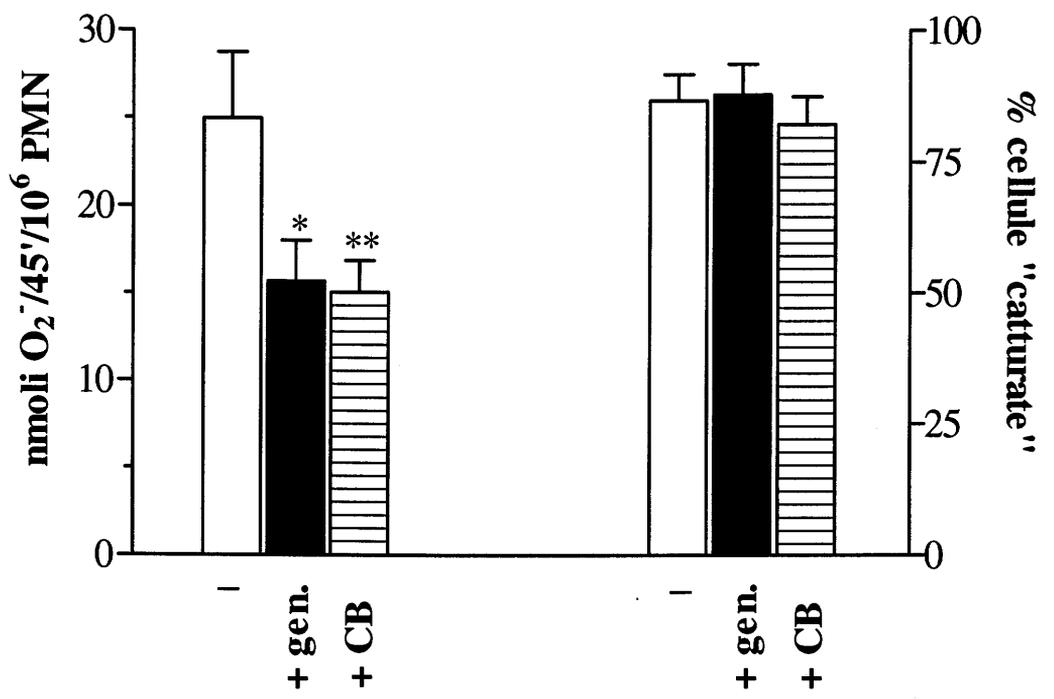
Si può supporre che, rispetto alla FN, una superficie rivestita di anticorpi offra ai PMN un numero maggiore di siti di legame per l'integrina in questione, o comunque che a parità di siti essi siano meglio distribuiti. Nonostante la FN rappresenti per i PMN un ligando polivalente, le sequenze di riconoscimento per $\alpha_L\beta_2$ potrebbero essere distanziate al punto da ostacolare un efficiente impegno della molecola di adesione, a meno che la cellula, andando incontro a *spreading*, non aumenti le probabilità di interazione $\alpha_L\beta_2$ -FN.

Nel modello dei mAb immobilizzati lo *spreading* non sarebbe quindi necessario ed in effetti la risposta metabolica che si osserva su *TS1-18* e *TS1-22* non è mai associata a questo tipo di morfologia. Tuttavia, anche in assenza di Ca^{2+}/Mg^{2+} i PMN appaiono comunque modificati dal trattamento con TNF (non sono tondeggianti come in condizioni *resting*, ma mostrano contorni irregolari e tentativi di protrusione di pseudopodi); ciò costituisce segno inequivocabile di un certo grado di riarrangiamento citoscheletrico forse paragonabile a quello che si osserva in PMN in sospensione (vedi cap. 4).

Quale importanza riveste questa modificazione morfologica per l'attivazione metabolica di PMN stimolati con TNF su *TS1-22*? Il grafico della *Figura 23* risponde al quesito dimostrando che l'aggiunta di CB o di genisteina al mezzo di incubazione, pur mantenendo inalterato il grado di «cattura» delle cellule da parte di questo anticorpo, fa diminuire in maniera significativa la relativa produzione di O_2^- . Se confrontiamo però questa inibizione (inferiore al 50 %) con l'abolizione totale della risposta al TNF in condizioni fisiologiche (vedi *Tab. IV*), risulta chiaro che le variazioni del grado di polimerizzazione dell'actina indotte dal TNF sono molto meno importanti in questo modello sperimentale di quanto non siano invece fisiologicamente, dove tutto evidentemente dipende da un appropriato «stiramento» della cellula sulla superficie.

Si può allora ridurre il ruolo del TNF nell'attivazione metabolica a semplice induttore di un'adesione cellulare che esita nello *spreading*, permettendo così un corretto aggancio $\alpha_L\beta_2$ -substrato? E' possibile che $\alpha_L\beta_2$, costitutivamente capace di segnalare per il *burst* [105], necessiti solo di interagire con la FN (o altra superficie permissiva) ad un livello quantitativamente sufficiente per esplicare la sua funzione?

Figura 23. Effetto della genisteina e della CB sulla produzione di O_2^- e sul grado di cattura di PMN incubati con TNF su mAb TS1/22 in fase fissa. L'immobilizzazione di TS1/22 si otteneva tramite rivestimento dei pozzetti con proteina G (MATERIALI E METODI, cap. 2 e). Le cellule (1.5×10^6 PMN/ml in HEPES•EDTA) venivano preincubate per 10' a 37°C, in sospensione, con o senza genisteina 50 μ M o CB a 5 μ g/ml. Venivano quindi aggiunte (50 μ l/prova) ai pozzetti, contenenti citocromo c (c.f.: 12 mM), TNF (c.f.: 10 ng/ml) e, nelle prove che lo richiedevano, genisteina o CB in quantità tali da mantenerne costante la concentrazione. La piastra veniva quindi incubata a 37°C per 45', durante i quali si valutava la produzione di O_2^- come descritto in MATERIALI E METODI, cap. 4, Ia. Al termine del saggio metabolico le stesse cellule, lavate con PBS tramite centrifugazione di 5' a 200 x g, venivano sottoposte al *test* di adesione (MATERIALI E METODI, cap. 4, II) per valutare il loro grado di cattura da parte di TS1/22. I dati sono le medie \pm ES dei risultati ottenuti in 3 esperimenti condotti in duplicato. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il *test* t di Student su dati non appaiati (una coda); * = significativo con $p < 0.05$.



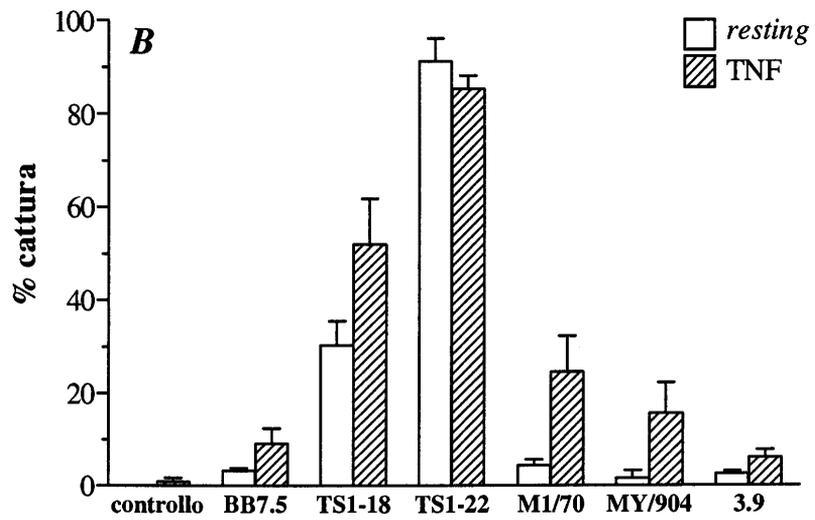
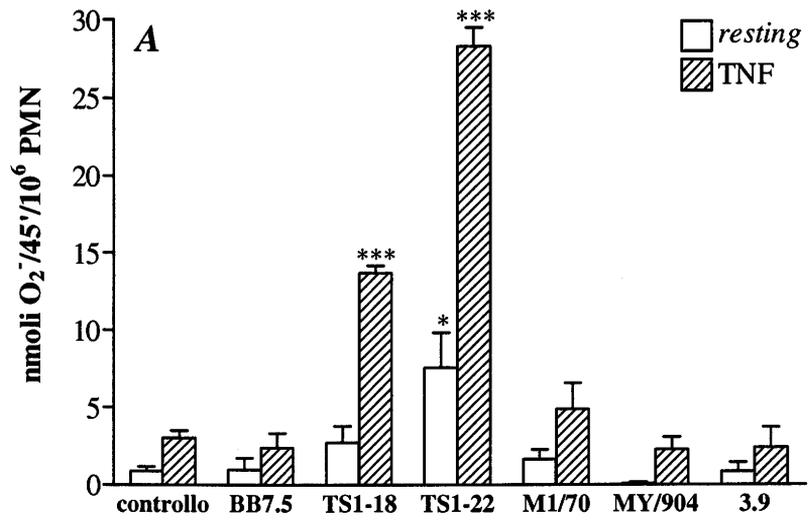
Il modello dei mAb immobilizzati su proteina G si è rivelato utile anche ad indagare questo aspetto, che si pone in realtà a monte delle problematiche finora affrontate e riguarda più strettamente il meccanismo di attivazione delle integrine β_2 ; infatti, in condizioni sperimentali che svincolano la risposta ossidativa da un'adesione cellulare attiva, facendola dipendere esclusivamente da un legame di tipo antigenico mAb-integrina, si può concretamente valutare se l'effetto del TNF diviene superfluo perché riconducibile alla sola iperespressione di $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$, normalmente responsabili dell'adesione dei PMN alla FN, o se rimane invece determinante nel rendere $\alpha_L\beta_2$ più competente alla segnalazione intracellulare. In quest'ultimo caso il TNF fungerebbe da attivatore della funzione di $\alpha_L\beta_2$, cui non basterebbe quindi l'interazione con il substrato per trasdurre il messaggio per la produzione di O_2^- ma che richiederebbe una modificazione conformazionale aggiuntiva a quella inducibile dal contatto stesso con il substrato, indipendente dalla presenza di Ca^{2+}/Mg^{2+} , e verosimilmente coinvolgente il dominio citoplasmatico dell'integrina.

Il grafico A della *Figura 24* riassume i risultati dello studio volto a chiarire se $\alpha_L\beta_2$ necessita dell'intervento attivatore del TNF per indurre la produzione di O_2^- o se invece è capace di farlo di per sé, essendole sufficiente un adeguato grado di «cattura» da parte del ligando (sia esso una proteina di matrice o l'anticorpo specifico). Come si può notare, anche in condizioni resting i PMN su *TS1-22* producono una significativa quantità di O_2^- che però viene quasi quadruplicata dall'aggiunta di TNF. Ciò non è tuttavia attribuibile ad un'aumentata «cattura» di cellule da parte del mAb (grafico B della stessa figura), in accordo con il dato di fatto che $\alpha_L\beta_2$ non è inducibile.

I risultati di questi esperimenti rappresentano quindi la prova inequivocabile che il TNF esalta l'intrinseca capacità di $\alpha_L\beta_2$ di mediare la risposta ossidativa, inducendo una qualche modificazione conformazionale della molecola stessa e/o una sua redistribuzione sulla membrana plasmatica, e non semplicemente ottimizzando l'interazione di $\alpha_L\beta_2$ con il substrato attraverso l'induzione di un'adesione mediata da $\alpha_M\beta_2$ e $\alpha_X\beta_2$.

Il grafico B della *Figura 24* è inoltre informativo dell'effetto del TNF su questi altri due tipi di integrine β_2 : in presenza della citochina aumenta infatti la «cattura» di cellule mediata da anti α_M e anti α_X , prova evidente dell'avvenuta iperespressione delle due integrine relative in seguito a trattamento con TNF. L'aggancio dei PMN da parte dei

Figura 24. Effetto del TNF sul metabolismo ossidativo e sul grado di cattura di PMN a contatto con mAb anti integrine immobilizzati. **A)** Le cellule venivano incubate con o senza TNF (c.f.:10 ng/ml) in pozzetti rivestiti con mAb su proteina G (MATERIALI E METODI, cap. 2 e). Per il resto, le condizioni sperimentali e il metodo di valutazione del metabolismo ossidativo erano quelli già descritti per la *Fig. 19*. Il grafico illustra i risultati di 3 esperimenti condotti in duplicato, espressi come medie \pm ES. L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il *test t* di Student su dati non appaiati (una coda). I livelli di significatività, indicati con la simbologia già adottata nelle figure precedenti, si riferiscono al confronto tra la produzione di O_2^- ottenuta sui vari mAb in PMN *resting* o stimolati con TNF, e quella di controllo misurata nelle condizioni sperimentali corrispondenti. **B)** il grado di «cattura» delle cellule si valutava al termine del saggio metabolico, utilizzando il *test* di adesione descritto in MATERIALI E METODI, cap. 4, II (lavaggio a 200 x g). I dati illustrati sono le medie \pm ES dei risultati 3 esperimenti condotti in duplicato.



mAb, dunque, non fa altro che rispecchiare i cambiamenti nell'espressione delle integrine β_2 in seguito alla stimolazione dei PMN con TNF.

Si constata comunque che la «cattura» delle cellule è massima proprio sulla superficie rivestita con *TS1-22*, dove si riscontra la risposta metabolica più elevata, mentre è molto bassa, sebbene significativa rispetto a quella delle cellule di controllo, la «cattura» su *3.9* (vedi anche *Fig. 21*). Da una parte ciò potrebbe essere comprensibile considerando che $\alpha_X\beta_2$ è poco espressa sui neutrofili e quindi che l'anticorpo interagente con i PMN attraverso di essa non sia in grado di garantire la «cattura» se non minima delle cellule. E' però anche vero che, dai risultati discussi nel paragrafo 5d e nei capitoli 6 e 7, $\alpha_X\beta_2$ sembra essere molto importante nell'adesione dei PMN sia a FN che a LM. Rimane quindi plausibile attribuire questa scarsa percentuale di «cattura» all'effetto penalizzante dell'EDTA.

Ma che dire a proposito di *M1/70*? Questo mAb non solo è diretto contro l'integrina maggiormente espressa sulla membrana plasmatica dei PMN, ma, in presenza di EDTA, mantiene comunque un'efficienza di legame mediamente superiore a quella degli altri anticorpi anti integrine (*Tab. VII*). Eppure la «cattura» di cellule attraverso $\alpha_M\beta_2$, anche utilizzando un mAb diretto contro un diverso epitopo (*MY/904*), è molto inferiore a quella ottenuta con *TS1-22*.

La spiegazione più soddisfacente e sicuramente più affascinante ci viene offerta da dati di letteratura che dimostrano l'esistenza, nei PMN come in altri tipi cellulari, di due pool di $\alpha_M\beta_2$ sulla membrana plasmatica: uno di essi (il cosiddetto pool immobile) sarebbe incapace di muoversi nell'ambito della membrana stessa, rimanendo ancorato al citoscheletro nella parte apicale della cellula; l'altro (il pool mobile) sarebbe invece in grado di spostarsi e accumularsi nei siti di contatto della cellula con il substrato [8, 33-35]. Non è improbabile che anche le popolazioni cellulari da noi studiate siano caratterizzate da questa particolare distribuzione; in questo caso, solo una frazione di tutte le $\alpha_M\beta_2$ esposte in superficie verrebbe coinvolta nella «cattura» dei PMN da parte di anticorpi anti α_M .

Nell'ambito degli stessi lavori ritroviamo pure delle interessanti evidenze riguardo $\alpha_X\beta_2$: questa integrina viene infatti descritta come scarsamente mobile nel piano della membrana plasmatica [35]; nel nostro modello sperimentale, in cui i PMN non hanno la possibilità di andare incontro a *spreading*, si può ipotizzare che non si verifichino quei riarrangiamenti citoscheletrici necessari al *clustering* (raggruppamento) di $\alpha_X\beta_2$ nella parte

della cellula a contatto con il substrato, con conseguente limitazione alla «cattura» di PMN attraverso questa integrina.

CONCLUSIONI

Nel loro complesso, i risultati presentati in questa tesi dimostrano che l'adesione a proteine della MEC, sebbene necessaria, non è sempre sufficiente a garantire una consistente risposta metabolica dei PMN al TNF: affinché si verifichi il *burst* respiratorio, le cellule aderenti devono instaurare con il substrato un contatto particolarmente stretto (*spreading*). E' stato altresì possibile evidenziare forme di *spreading* che, sebbene paragonabili da un punto di vista quantitativo (grado di polimerizzazione citoscheletrica, Fig. 9), risultavano qualitativamente diverse in quanto a permissività ai fini del *burst*. Gli studi condotti hanno permesso di stabilire che è il tipo di assetto integrinico coinvolto nell'adesione dei PMN al substrato a modulare la risposta metabolica di queste cellule al TNF. In particolare, analizzando in parallelo ciò che accade sulla FN (prototipo di superficie permissiva al *burst*) e sulla LM (superficie non permissiva), è emerso che:

I) l'adesione, sia a FN che a LM, dei PMN stimolati con TNF è attribuibile all'impegno delle integrine β_2 ;

II) la qualità della risposta ossidativa al TNF dipende dal coinvolgimento differenziale delle tre integrine β_2 espresse dai neutrofili. Infatti, è stato dimostrato che:

1. $\alpha_L\beta_2$, impegnata sulla FN, è in grado di trasdurre al neutrofilo il segnale per la produzione di O_2^- ; questa sua attitudine, rilevabile anche nelle cellule a riposo (Fig. 24), viene esaltata dalla presenza del TNF che in qualche modo attiva l'integrina rendendola più competente nella segnalazione. $\alpha_L\beta_2$ appare nello stesso tempo estranea al fenomeno prettamente adesivo e sembra anzi necessitare dell'impegno delle altre due integrine leucocitarie per poter interagire con la FN in modo adeguato ai fini del *burst*.

2. $\alpha_M\beta_2$, impegnata su FN e su LM, è incapace di mediare direttamente l'attivazione metabolica, ma si rivela importante nel modularla indirettamente, in quanto garantisce il coinvolgimento di $\alpha_L\beta_2$ sul substrato permissivo. Questo ruolo unicamente proadesivo di $\alpha_M\beta_2$ è sostenuto dalle seguenti evidenze:

a) sulla LM, dove $\alpha_M\beta_2$ è efficacemente impegnata nell'assicurare l'adesione dei PMN stimolati con TNF, il *burst* non si verifica;

b) sulla FN l'inibizione della risposta metabolica da parte dell'anticorpo anti α_M (M1/70) è della stessa entità (~ 50%) rispetto all'inibizione dell'adesione (Fig. 15, 17), il che fa

supporre che *M1/70* interferisca con la produzione di O_2^- solo nella misura in cui riesce a staccare i PMN dal substrato.

c) il *crosslinking* di $\alpha_M\beta_2$ tramite mAb immobilizzati (*Fig. 22*) non è in grado di innescare l'attivazione metabolica dei PMN stimolati con TNF.

3. $\alpha_X\beta_2$ non è in grado di trasdurre alla cellula il segnale per il *burst*; infatti:

a) oltre che nell'adesione alla FN, essa risulta coinvolta anche in quella alla LM, dove però non si registra attivazione metabolica in seguito a stimolazione dei PMN con TNF;

b) il *crosslinking* di $\alpha_X\beta_2$ non esita nella produzione di O_2^- .

D'altra parte bisogna osservare che l'inibizione della risposta metabolica su FN da parte dell'anticorpo anti α_X è molto consistente (addirittura superiore a quella da anti α_L) e non totalmente attribuibile alla parallela inibizione dell'adesione (*Fig. 15, 17*). Inoltre, negli esperimenti di valutazione diretta dell'attitudine segnalatoria delle varie integrine (modello degli anticorpi immobilizzati), $\alpha_X\beta_2$ risulta fortemente penalizzata: oltre ad essere di per sé poco espressa sulla plasmamembrana, il suo impegno da parte del mAb 3.9 è sfavorito dalle particolari condizioni sperimentali adottate (*Tab. VII, Fig. 21*).

Nel tentativo di conciliare i risultati degli esperimenti di *crosslinking* con quelli ottenuti sulla FN in condizioni fisiologiche, ed alla luce delle sempre più numerose evidenze circa la cooperazione interrecettoriale che vede coinvolte le integrine β_2 (vedi INTRODUZIONE, cap. 8), si può speculare che $\alpha_X\beta_2$ sia fisicamente e/o funzionalmente associata con la stessa $\alpha_L\beta_2$ o con qualche altra molecola segnalatoria: pur non essendo direttamente in grado di mediare la produzione di O_2^- , $\alpha_X\beta_2$ potrebbe essere fondamentale nel garantire il contatto ottimale di $\alpha_L\beta_2$ (o altra molecola) con la FN, ma potrebbe altresì trasdurre alla cellula un segnale accessorio a quello innescato da $\alpha_L\beta_2$, con funzione regolatoria, come già dimostrato per $\alpha_V\beta_3$ nei confronti di $\alpha_5\beta_1$ [131, 132]. Una vicinanza fisica di $\alpha_X\beta_2$ e $\alpha_L\beta_2$ potrebbe essere responsabile del massiccia inibizione del *burst* su FN da parte del 3.9 anche da un punto di vista puramente tecnico: l'anticorpo, pur legandosi specificamente ad $\alpha_X\beta_2$, impedirebbe per ingombro sterico anche l'interazione di $\alpha_L\beta_2$ con la FN.

I risultati ottenuti circa l'importanza della polimerizzazione citoscheletrica nella risposta dei PMN al TNF, vuoi in condizioni fisiologiche vuoi su *TS1-22* immobilizzato, suggeriscono infine che lo *spreading* è necessario alla risposta metabolica dei PMN al TNF

solo nella misura in cui, attraverso lo «stiramento» delle cellule sul substrato, consente un efficiente impegno dell'integrina segnalatrice ($\alpha_L\beta_2$).

BIBLIOGRAFIA

1. Cotran R.S., V. Kumar and S.L. Robbins: *Pathologic Basis of Disease*. Saunders ed., V edizione 1994.
2. Hynes R.O.: *Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion*. *Cell* 1992; 69: 11.
3. Yamada K.M. and S. Miyamoto: *Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control*. *Current Biol.* 1995; 7: 681.
4. Dustin M.L., O. Carpen and T. Springer: *Regulation of locomotion and cell-cell contact area by the LFA-1 and ICAM-1 adhesion receptors*. *J. Immunol.* 1992; 148: 2654.
5. Springer T.: *Adhesion receptors of the immune system*. *Nature* 1990; 346: 425.
6. Berton G., S.R. Yan, L. Fumagalli and C.A. Lowell: *Neutrophil activation by adhesion: mechanism and pathophysiological implications*. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 1996; 26: 160.
7. Varner J.A. and D.A. Cheresh: *Integrins and cancer*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1996; 8: 724.
8. Arnaout M.A.: *Structure and Function of the Leukocyte Adhesion Molecules CD11/CD18*. *Blood* 1990; 75: 1037.
9. Burridge K., K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls and C. Turner: *Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and cytoskeleton*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1988; 4: 487.
10. Tawil N., P. Wilson and S. Carbonetto: *Integrins in point contacts mediate cell spreading: factors that regulate integrin accumulation in point vs. focal contacts*. *J. Cell Biol.* 1993; 120: 261.
11. Horwitz A., K. Duggan, C. Bluck, M.C. Beckerle and K. Burridge: *Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin-a transmembrane linkage*. *Nature* 1986; 320: 531.
12. Otey C.A., F.M. Pavalko and K. Burridge: *An interaction between α -actinin and the β_1 integrin subunit in vitro*. *J. Cell Biol.* 1990; 111: 721.
13. Pavalko F.M. and S.M. LaRoche: *Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin β_2 subunit (CD18) and the actin binding protein α -actinin*. *J. Immunol.* 1993; 151: 3795.
14. Sharma C.P., R.M. Ezzell and M.A. Arnaout: *Direct interaction of filamin (ABP-280) with the β_2 -integrin subunit CD18*. *J. Immunol.* 1995; 154: 3461.
15. Schaller M.D. and J.T. Parsons: *Focal adhesion kinase and associated proteins*. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994; 6: 705.

16. Miyamoto S., S.K. Akiyama and K.M. Yamada: *Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function.* *Science* 1995; 267: 883.
17. Shattil S. and M. Ginsberg: *Integrin signaling in vascular biology.* *J. Clin. Invest.* 1997; 100: S91.
18. Stewart M., M. Thiel and N. Hogg: *Leukocyte integrins.* *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995; 7: 690.
19. Anderson D.C. and T.A. Springer: *Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1 and gp150,95 glycoproteins.* *Annu. Rev. Med.* 1987; 38: 175.
20. Mentzer S.J., S.H. Gromkowski, A.M. Krensky, S.J. Burakoff and E. Martz: *LFA-1 membrane molecule in the regulation of homotypic adhesion of human B lymphocytes.* *J. Immunol.* 1985; 135: 9.
21. Miedema F., P.A.T. Tetteroo, F.G. Terpstra, G. Keizer, M. Roos, R.S. Weening, C.M.R. Weemaes, D. Roos and C.J.M. Melief: *Immunologic studies of LFA-1 and Mo1-deficient lymphocytes from a patient with recurrent bacterial infections.* *J. Immunol.* 1985; 134: 3075.
22. Arnaout M.A., H. Spits., C. Terhorst, J. Pitt and R. F. Todd III: *Deficiency of a leukocyte surface glycoprotein (LFA-1) in two patients with Mo1 deficiency. Effects of cell activation on Mo1/LFA-1 surface expression in normal and deficient leukocytes.* *J. Clin. Invest.* 1984; 74: 1291
23. Sharar S.R., D.D. Mihelcic, K.T. Han, J.M. Harlan and R.K. Winn: *Ischemia reperfusion injury in the rabbit ear is reduced by both immediate and delayed CD18 leukocyte adherence blockade.* *J. Immunol.* 1994; 153: 2234.
24. Farhood A., G.M. McGuire, A.M. Manning, M. Miyasaka, C.W. Smith and H. Jaeschke: *Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia reperfusion injury in rat liver.* *J. Leukoc. Biol.* 1995; 57: 368.
25. Fisher A., P.H. Trung, B. Descamps-Latscha, B. Lisowska-Grospierre, I. Gerota, N. Perez, C. Scheinmetzler, A. Durandy, J.L. Virelizier and C. Griscelli: *Bone marrow transplantation for inborn error of phagocytic cells associated with defective adherence, chemotaxis and oxidative response during opsonized particle phagocytosis.* *Lancet* 1983; 2: 473.
26. Danilenko D.M., P.V. Rossitto, M. Van der Vieren, H. Le Trong, S.P. McDonough, V. K. Affolter and P. F. Moore: *A novel canine leukointegrin, $\alpha_4\beta_2$, is expressed by specific macrophage subpopulations in tissue and a minor CD8⁺ lymphocyte subpopulation in peripheral blood.* *J. Immunol.* 1995; 155: 35.
27. Miller J.M., R. Schwarting and T.A. Springer: *Regulated expression of the Mac-1, LFA-1, p150,95 glycoprotein family during leukocyte differentiation.* *J. Immunol.* 1986; 137: 2891.
28. Fryer D.R., M.L. Morganroth, C.E. Rogers, M.A. Arnout and R.F. Todd III: *Regulation of surface glycoproteins CD11/CD18 (Mo1, LFA-1, p150/95) by human*

mononuclear phagocytes.

J. Clin. Immunol. Immunopathol. 1988; 46: 272.

29. Arnaout M.A., H. Spits, C. Terhost, J. Pitt and R.F. Todd III: ***Deficiency of a leukocyte surface glycoprotein (LFA-1) in two patients with Mo1 deficiency. Effects of cell activation on Mo1/LFA-1 surface expression in normal and deficient leukocytes.***

J. Clin. Invest. 1984; 74: 1291.

30. Todd R.F. III, M.A. Arnaout, R.E. Rosin, C.A. Crowley, W.A. Peters, J.T. Curnutte and B.M. Babior: ***Subcellular localization of the subunit of Mo1 (Mo1 alpha; formerly gp110), a surface glycoprotein associated with neutrophil adhesion.***

J. Clin. Invest. 1984; 74: 1280.

31. Miller L.J., D.F. Bainton, N. Borregaard and T.A. Springer: ***Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface.***

J. Clin. Invest. 1987; 80: 535.

32. Hughes B.J., J.C. Hollers, E. Crockett-Torabi and C.W. Smith: ***Recruitment of CD11b/CD18 to the neutrophil surface and adherence-dependent cell locomotion.***

J. Clin. Invest. 1992; 90: 1687.

33. Graham I.L., H.D. Gresham and E.J. Brown: ***An immobile subset of plasma membrane CD11b/CD18 (Mac-1) is involved in phagocytosis of targets recognized by multiple receptors.***

J. Immunol. 1989; 142: 2352.

34. Diamond M.S. and T.A. Springer: ***A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen.***

J. Cell Biol. 1993; 120: 545.

35. 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 iC3b Opsonized Erythrocytes.***

J. Leuk. Biol. 1992; 51: 109.

36. Kupfer A. and S.J. Singer: ***Molecular dynamics in the membranes of helper T cells.***

Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 1988; 85: 8216.

37. Hogg N.: ***Regulation of β_2 integrin function.***

Integrins in the regulation of leukocyte function and leukocyte-dependent tissue injury. Garda (Lake of Garda, Verona, Italy) 1998.

38. Stewart M.P., A. McDowall and N. Hogg: ***LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca^{2+} -dependent protease, calpain.***

J. Cell Biol. 1998; 140 (3): 699-707.

39. Van der Vieren M., H. Le Trong, C.L. Wood, P.F. Moore, T.S. John, D.E. Staunton and W.M. Gallatin: ***A novel leukointegrin, $\alpha_4\beta_2$, binds preferentially to ICAM-3.***

Immunity 1995; 3: 683.

40. Pigott R. and C. Power: ***The Adhesion Molecule FactsBook***

1993.

41. Wright S.D., P.E. Rao, W.C. Van Voorhis, L.S. Craigmyle, K. Iida, M.A. Talle, E.F. Westberg, G. Goldstein and S.C. Silverstein: ***Identification of C3bi receptor of human monocytes and mactophages by using monoclonal antibodies.***

Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 1983; 80: 5699.

42. Bilsland C.A.G., M.S. Diamond and T.A. Springer: *The leukocyte integrin p150,95 (CD11c/CD18) as a receptor for iC3b.*
J. Immunol. 1994; 152: 4582.
43. Loftus J.C. and R.C. Liddington: *New insights into integrin-ligand interaction.*
J. Clin. Invest. 1997; S77.
44. Lee Jie-O, L.A. Bankston, M.A. Arnaout and R.C. Liddington: *Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation.*
Structure 1995; 3: 1333.
45. Girma J.-P., D. Meyer, C.L. Verweij, H. Pannecoeck and J.J. Sixma: *Structure-function relationship of human von Willebrand factor.*
Blood 1987; 70: 605.
46. Michishita M., V. Videm and M.A. Arnaout: *A novel divalent cation binding site in the A-domain of the β_2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding.*
Cell 1993; 72: 857.
47. Randi A.M. and N. Hogg: *I domain of β_2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1 contains a binding site for ligand intercellulare molecule-1.*
J. Biol. Chem. 1994; 269: 1.
48. Ueda T. P. Rieu, J. Brayer and M.A. Arnaout: *Identification of the complement iC3b binding site in the β_2 integrin CR3 (CD11b/CD18).*
Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 1994; 91: 10680.
49. Zhou L., D.H.S. Lee, J. Plescia, C.Y. Lau and D.C. Altieri: *Differential ligand binding specificities of recombinant CD11b/CD18 integrin I-domain.*
J. Biol. Chem. 1994; 269: 17075.
50. Diamond M.S., J. Garcia-Aguilar, J.K. Bickford, A.L. Corbi and T.A. Springer: *The I-Domain is a major recognition site on leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands.*
J. Cell Biol. 1993;120: 1031.
51. Annenkov A., S. Ortlepp and N. Hogg: *The β_2 integrin Mac-1 but not p150/95 associates with Fc γ RIIA.*
Eur. J. Immunol. 1996; 26: 207.
52. Smith C.W., S.D. Marlin, R. Rothlein, C. Toman and D.C. Anderson: *Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with ICAM-1 molecule in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro.*
J. Clin. Invest. 1989; 83: 2008.
53. Kishimoto T.K., K. O'Connor and T.A. Springer: *Leukocyte adhesion deficiency: aberrant splicing of a conserved integrin sequence causes a moderate deficiency phenotype.*
J. Biol. Chem. 1989; 264: 3588.
54. Wright S.D., J.I. Weitz, A.J. Huang, S.M. Levin, S.C. Silverstein and J.D. Loike: *Complement receptor type three (CD11b/CD18) of human polymorphonuclear leukocytes recognizes fibrinogen.*
Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 1988; 85: 7734.
55. Wright S.D. and B.C. Meyer: *Phorbol esters cause sequential activation and deactivation of complement receptors on polymorphonuclear leukocytes.*
J. Immunol. 1986; 136: 1759.
56. Sheikh S. and G.B. Nash: *Continuous activation and deactivation of integrin CD11b/CD18 during de novo expression enables rolling neutrophils to immobilize*

on platelets.

Blood 1996; 87: 5040.

57. Ginsberg M.H., X. Du and E.F. Plow 1992: *Inside-out integrin signalling.*
Curr. Op. Cell Biol. 1992;4: 766.
58. Humphries M.J.: *Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction.*
Curr. Op. Cell Biol. 1996; 8: 632.
59. Lundgren-Akerlund E., E. Berger and K. Arfors: *Effect of divalent cations on adhesion of polymorphonuclear leukocytes to matrix molecules in vitro.*
J. Leuk. Biol. 1992; 51: 603.
60. Dransfield I, C. Cabanas, A. Craig and N. Hogg: *Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1.*
J. Cell Biol. 1992; 116: 219.
61. Qu A. and D.J. Leahy: *The role of the divalent cation in the structure of the I domain from the CD11a/CD18 integrin.*
Structure 1996; 4: 931.
62. Altieri D.C.: *Occupancy of CD11/bCD18 (Mac-1) divalent ion binding-site(s) induces leukocyte adhesion.*
J. Immunol. 1991; 147: 1891.
63. Mould A.P., A.N. Garratt, J.A. Askari, S.K. Akiyama and M.J. Humphries: *Identification of a novel anti-integrin monoclonal antibody that recognizes a ligand-induced binding site epitope on the β_1 subunit.*
FEBS Lett. 1995; 363: 118.
64. Bazzoni G, D.T. Shih, C.A. Buck and M.E. Hemler: *Monoclonal antibody 9EG7 defines a novel β_1 integrin epitope induced by soluble ligand and manganese, but inhibited by calcium.*
J. Biol. Chem. 1995; 270: 25570.
65. Hogg N., J. Harvey, C. Cabanas and R.C. Landis: *Control of leukocyte integrin activation.*
Am. Rev. Respir. Dis. 1993; 148: s55.
66. Sanford J.S. and M.H. Ginsberg: *Integrin signaling in vascular biology.*
J. Clin. Invest. 1997; 100: S91.
67. Lollo B.A., K.W.H. Chan, E. Hanson, V.T. Moy and A.A. Brian: *Direct evidence for two affinity states for lymphocyte function-associated antigen 1 on activated T cells.*
J. Biol. Chem. 1993; 268: 21693.
68. Hotchin N.A. and A. Hall: *The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTP-ases.*
J. Cell Biol. 1995; 131: 1857.
69. Nobes C.D. and A. Hall: *Rho, Rac and Cdc42 GTP-ases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibres, lamellipodia and filipodia.*
Cell 1995; 81: 53.
70. Detmers P.A., S.D. Wright, E. Olsen, B. Kimball and Z.A. Cohn: *Aggregation of complement receptors on human neutrophils in the absence of ligand.*
J. Cell Biol. 1987; 105: 1137.
71. Dustin M.L. and T.A. Springer: *T cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1.*
Nature (London) 1989; 341: 619.

72. Buyon J.P., S.B. Abramson, M.R. Philips, S.G. Slade, G.D. Ross, G. Weissman and R.J. Winchester: ***Dissociation between increased surface expression of Gp165/95 and homotypic neutrophil aggregation.***
J. Immunol. 1988; 140: 3156.
73. Lo S.K., P.A. Detmers, S.M. Levin and S.D. Wright: ***Transient adhesion of neutrophils to endothelium.***
J. Exp. Med. 1989; 169: 1779.
74. Dransfield I, C. Cabanas, J. Barrett and N. Hogg: ***Interaction of leukocyte integrins with ligand is necessary but not sufficient for function.***
J. Cell Biol. 1992; 116: 1527.
75. Robinson M.K., D. Andrew, H. Rosen, D. Brown, S. Ortlepp, P. Stephens and E.C. Butcher: ***Antibody against the Leu-cam-b-chain (CD18) promotes both LFA-1- and CR3-dependent adhesion events.***
J. Immunol. 1992; 148: 1080.
76. Petty H.R. and R.F. Todd II: ***Integrins as promiscuous signal transduction devices.***
Immunol. Today 1996; 17: 209.
77. Huizinga, T.W.J., K.M. Dolman, N.J.M. von der Linden, M. Kleijer, J.H. Nuijenes, A.E.G. Kr. von de Borne and D. Ross: ***Phosphatidylinositol linked Fc γ RIII mediates exocytosis of neutrophil granule protein, but does not mediate initiation of the respiratory burst.***
J. Immunol. 1990; 144: 1432.
78. Petty H.R., A.L. Kindzelskii, Y. Adachi and R.F. Todd III: ***Ectodomain interactions of leukocyte integrins and pro-inflammatory GPI linked membrane proteins.***
J. Pharm. Bioch. Anal. 1997; 15: 1405.
79. Zhou M-J., R. F. Todd III, J.G.J. von de Winked, and H.R. Petty: ***Cocapping of the leukocytes adhesion molecules complement recertor type 3 and lymphocyte function-associated antigen 1 with Fc γ receptor III on human neutrophils.***
J. Immunol. 1993; 150: 3030.
80. Stockinger H.: ***Interaction of GPI-anchored cell surface proteins and complement receptor type 3.***
Exp. Clin. Immunogenet. 1997; 14: 5.
81. Zhou M-J. and E.J. Brown: ***CR3 (Mac-1, $\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) and Fc γ RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc γ RII and tyrosine phosphorylation.***
J. Cell Biol. 1994; 125: 1407.
82. Borregaard N.: ***Current concepts about neutrophil granule physiology.***
Curr. Opin. Hematol. 1996; 3: 11.
83. Zarewych D.M., A.L. Kindzelskii, R.F. Todd III and H.R. Petty: ***LPS induces CD14 association with complement receptor type 3, which is reversed by neutrophil adhesion.***
J. Immunol. 1996; 156: 430.
84. Galon J., J.-F. Gauchat, N. Mazières, R. Spagnoli, W. Storkus, M. Lotze, J.-Y. Bonnefoy, W.-H. Fridman and C. Sautès: ***Soluble Fc γ Receptor type III (Fc γ RIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors.***
J. Immunol. 1996; 157: 1184
85. Sutterwala F.S., L.A. Rosenthal and D.M. Mosser: ***Cooperation between CR1 (CD35) and CR3 (CD11b/CD18) in the binding of complement-opsonized particles.***
J. Leukoc. Biol. 1996; 59: 883.

86. Nathan C. F.: *Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes.* *J. Clin. Invest.* 1987; 80: 1550.
87. Menegazzi R., R. Cramer, P. Patriarca, P. Scheurich and P. Dri: *Evidence that tumor necrosis factor α (TNF)-induced activation of neutrophil respiratory burst on biological surfaces is mediated by the p55 receptor.* *Blood* 1994; 84: 287.
88. Richter J., J. Ng-Sikorski, I. Olsson and T. Andersson: *Tumor necrosis factor-induced degranulation in adherent human PMNs is dependent on CD11b/CD18 integrin-triggered oscillations of cytosolic free Ca^{2+} .* *Proc. Natl. Acad.* 1990; 87: 9472.
89. Richter J., T. Andersson and I. Olsson: *Effect of tumor necrosis factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on neutrophil degranulation.* *J. Immunol.* 1989; 142: 3199.
90. Nathan C. F.: *Respiratory burst in adherent human PMNs: triggering by colony-stimulating factors CSF-GM and CSF-G.* *Blood* 1989; 73: 301.
91. Shappel S. B., C. Toman, D. C. Anderson, A. A. Taylor M. L., Entman and C. W. Smith: *Mac-1 (CD11b/CD18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils.* *J. Immunol.* 1990; 144: 2702.
92. Suchard S. J., T. Nakamura, A. Abe, J. A. Shayman and L. A. Boxer: *Phospholipase D-mediated diacylglycerol formation coincides with H_2O_2 and lactoferrin release in adherent human neutrophils.* *J. Cell Biol.* 1994; 269: 8063.
93. Tartaglia L.A. and D.P. Goeddel: *Two TNF receptors.* *Immunol. Today* 1992; 13: 151.
94. Nathan C. F. and E. Sanchez: *Tumor necrosis factor and CD11/CD18 (β_2) integrins act synergistically to lower cAMP in human PMNs.* *J. Cell Biol.* 1990; 111: 2171.
95. Fuortes M., W. W. Jin and C. Nathan: *Adhesion-dependent protein tyrosine phosphorylation in neutrophils treated with tumor necrosis factor.* *J. Cell Biol.* 1993; 120: 777.
96. Suchard J. and L. A. Boxer: *Exocytosis of a subpopulation of specific granules coincides with H_2O_2 production in adherent human neutrophils.* *J. Immunol.* 1994; 152: 290.
97. Nathan C. F., S. Srimal, C. Farber, E. Sanchez, L. Kabbash, A. Asch, J. Gailit and S. D. Wright: *Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins.* *J. Cell Biol.* 1989; 109: 1341.
98. Dri P., R. Cramer, M. Romano, P. Spessotto and P. Patriarca: *Effect of biological surfaces on neutrophil O_2^- production and its relationship to the CD11b/CD18 integrin-dependent adherence.* *Int. J. Tissue React.* 1991; 13: 193.
99. Pavalko F.M. and S.M. LaRoche: *Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin β_2 subunit (CD18) and the actin binding protein α -actinin.* *J. Immunol.* 1993; 151: 3795.

100. Walzog B., S. Offermanns A. Zakrzewicz, P. Gaetgens and K. Ley: *β_2 integrins mediate protein tyrosine phosphorylation in human neutrophils.* *J. Leukoc. Biol.* 1996; 59: 747-753.
101. Graham I.L., D.C. Anderson, V.M. Holers and E.J. Brown: *Complement receptor 3 (CR3, Mac-1, integrin $\alpha_M\beta_2$, CD11/CD18) is required for tyrosine phosphorylation of paxillin in adherent and non adherent neutrophils.* *J. Cell Bio.* 1994; 127: 1139.
102. Fuortes M., W.W. Jin and C.F. Nathan: *β_2 integrin-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin in human neutrophils treated with tumor necrosis factor.* *J. Cell Biol.* 1994; 127: 1477.
103. Yan S. R., L. Fumagalli and G. Berton: *Tumor necrosis factor triggers redistribution to a Triton X-100-insoluble, cytoskeletal fraction of β_2 integrins, NADPH oxidase components, tyrosine phosphorylated proteins, and the protein tyrosine kinase p58^{lgr} in human neutrophils adherent to fibrinogen.* *J. Leukoc. Biol.* 1995; 58: 595.
104. Jaconi M.E.E., J.M. Theler, W. Schlegel, R.D. Appel, S. D. Wright and P.D. Lew: *Multiple elevation of cytosolic-free Ca^{2+} in human neutrophils: initiation by adherence receptors of the integrin family.* *J. Cell Biol.* 1991; 112: 1249.
105. Petersen M., J.D. Williams and M.B. Hallett: *Cross-linking of CD11b or CD18 signals release of localized Ca^{2+} from intracellular stores in neutrophils.* *Immunol.* 1993; 80: 157.
106. Berton G., C. Laudanna, C. Sorio and F. Rossi: *Generation of signals activating PMN functions by leukocyte integrins: LFA-1 and gp150/95, but not CR3, are able to stimulate the respiratory burst of human PMNs.* *J. Cell Biol.* 1992; 116: 1007.
107. Garnotel R., J.-C. Monboisse, A. Randoux, B. Haye and J.P. Borel: *The binding of type I collagen to lymphocyte function-associated antigen (LFA) I integrin triggers the respiratory burst of human polymorphonuclear neutrophils.* *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 27495.
108. Ruf A. and H. Patscheke: *Platelet-induced neutrophil activation: platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11c/CD18.* *British J. Hemat.* 1995; 90: 791.
109. Ruoslahti E., E.G. Hayman, M.D. Pierschbacher and E. Engvall: *Fibronectin: purification, immunochemical properties and biological activities.* *Methods Enzymol.* 1982; 82: 803.
110. Springer T.A.: *Integrins and G proteins: structurally homologous proteins that regulate interactions outside and inside the cell membrane.* *Integrins in the regulation of leukocyte function and leukocyte-dependent tissue injury. Garda (Lake of Garda, Verona, Italy) 1998.*
111. Thornton B.P., V. Vetvicka, M. Pitman, R.C. Goldman and G.D. Ross: *Analysis of the sugar specificity and molecular location of the β -glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18).* *J. Immunol.* 1996; 156: 1235.
112. Wright S.D., S.M. Levin, M.T. C. Jong, Z. Chad and L.G. Kabbash: *CR3 (CD11b/CD18) expresses one binding site for Arg-Gly-Asp-containing peptides and a*

- second site for bacterial lipopolysaccharide.*
J. Exp. Med. 1989; 169: 175.
113. Cramer R., M.R. Soranzo, P. Dri, R. Menegazzi, A. Pitotti, G. Zabucchi and P. Patriarca: *A simple and reliable assay for myeloperoxidase activity in mixed neutrophil-eosinophil cell suspension: application to detection of myeloperoxidase deficiency.*
J. Immunol. Methods 1984; 70: 119.
114. Mariani M., M. Camagna, L. Tarditi and E. Seccamani: *A new enzymatic method to obtain high-yield F(ab')₂ suitable for clinical use from mouse IgG1.*
Mol. Immunol. 1991; 28: 69.
115. Patriarca P., R. Menegazzi, R. Cramer, P. Dri, S. Busetto and E. Decleva: *Activation of neutrophil and eosinophil respiratory burst by TNF- α on biological surfaces.*
Reg. Immunol. 1995; 6: 1.
116. Dapino P., F. Dallegri, L. Ottonello and C. Sacchetti: *Induction of neutrophil respiratory burst by tumor necrosis factor-alpha; priming effect of solid-phase fibronectin and intervention of CD11b/CD18 integrins.*
Clin. Exp. Immunol. 1993; 94: 533.
117. Thompson H.L. and K. Matsushima: *Human polymorphonuclear leukocytes stimulated by tumor necrosis factor α Show Increased Adherence to Extracellular Matrix Proteins which Is Mediated Via the CD11b/18 Complex.*
Clin. Exp. Immunol. 1992; 90: 280.
118. Burridge K., C.E. Turner and L.H. Romer: *Tyrosin phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly.*
J. Cell Biol. 1992; 119: 893.
119. Rieu P., P. Lesavre and L. Halbwachs-Mecarelli: *Evidence for integrins other than β_2 on PMN neutrophils: expression of $\alpha_6\beta_1$ heterodimer.*
J. Leukoc. Biol. 1993; 53:576.
120. Bohnshack J.: *CD11/CD18-independent neutrophil adherence to laminin is mediated by the integrin VLA-6.*
Blood 1992; 79: 1545.
121. Wang J. S., N. Pavlotsky, A. I. Tauber and K. S. Zaner: *Assembly dynamics of actin in adherent human neutrophils.*
Cell. Motil. Cytoskeleton. 1993; 26:340.
122. Thompson H.L. and K. Matsushima: *Human polymorphonuclear leukocytes stimulated by tumor necrosis factor α show increased adherence to extracellular matrix proteins which is mediated via the CD11b/CD18 complex.*
Clin. Exp. Immunol. 1992; 90:280.
123. Singer I.I., S. Scott, D.W. Kawka and D.M. Kazazis: *Adhesomes: specific granules containing receptors for laminin, iC3b/fibrinogen, fibronectin and vitronectin in human polymorphonuclear leukocytes and monocytes.*
J. Cell Biol. 1989; 109: 3169.
124. Sanchez-Madrid F., A.M. Krensky, C.F. Ware, E. Robbins, J.L. Strominger, S.J. Burakoff and T.A. Springer: *Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, and LFA-3.*
Proc. Natl. Acad. 1982; 79: 7489.
125. Sanchez-Madrid F., P. Simon, S. Thompson and T.A. Springer: *Mapping of antigenic and functional epitopes on the α and β subunits of two related mouse glycoproteins*

- involved in cell interactions, LFA-1 and Mac-1.*
J. Exp. Med. 1983; 158: 586.
126. Dana N., B. Styrt, J.D. Griffin, R.F. Todd III, M.S. Klempner and M.A. Arnaout: *Two functional domains in the phagocyte membrane glycoprotein Mo1 identified with monoclonal antibodies.*
J. Immunol. 1986; 137: 3259.
127. Myones B.L., J.G. Dalzell, N. Hogg and G.D. Ross: *Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR₄) activity resembling CR₃.*
J. Clin. Invest. 1988; 82: 640.
128. Huizinga T.W., K.M. Dolman, N.J. van der Linden et al.: *The 40-kDa Fc gamma receptor (FcRII) on human neutrophils is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis.*
J. Immunol. 1989; 142: 2365.
129. Liles W.C., J.A. Ledbetter, A.W. Walterdorff and S.J. Klebanoff: *Cross-linking of CD18 primes neutrophils for activation of the respiratory burst in response to specific stimuli: implications for adhesion-dependent physiological responses in neutrophils.*
J. Leukoc. Biol. 1995; 58: 690.
130. Cai T.Q., S.K. Law, H.R. Zhao and S.D. Wright: *Reversible inactivation of purified leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, alpha m beta 2) by removal of divalent cations from a cryptic site.*
Cell. Adhes. Commun. 1995; 3: 399.
131. Charo J.F., L. Nannizzi, J.W. Smith and D.A. Cheresh: *The vitronectin receptor $\alpha_v\beta_3$ binds fibronectin and acts in concert with $\alpha_5\beta_1$ in promoting cellular attachment and spreading on fibronectin.*
J. Cell Biol. 1990; 111: 2795.
132. Blystone S.D., I.L. Graham, F.P. Lindberg and E. Brown: *Integrin $\alpha_v\beta_3$ differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor $\alpha_5\beta_1$.*
J. Cell Biol. 1994; 127: 1129.