



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
ROMA
"TOR VERGATA"**

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E
NATURALI

DOTTORATO DI RICERCA IN
IMMUNOLOGIA

CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO
XX

Titolo della tesi

La fosfolipasi C specifica per fosfatidilcolina nelle
cellule Natural Killer: studio degli aspetti funzionali e
del traffico recettoriale del CD16

Dottorando:

Dr.ssa Serena Cecchetti

Docente Guida/Tutor: Dr. Carlo Ramoni

Coordinatore: Prof. Paolo Rossi

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. Le cellule Natural Killer umane.....	4
1.1.2. Marcatori fenotipici di membrana.....	6
1.1.3. Recettori attivatori e inibitori.....	8
1.1.4. Il recettore CD16 e i meccanismi litici CD16-mediati.....	13
1.2. Le fosfolipasi.....	18
1.2.1. La fosfolipasi C specifica per fosfatidilcolina (PC-PLC).....	22
2. MATERIALI E METODI.....	28
2.1. Preparazione delle cellule mononucleate e dei linfociti del sangue periferico umano.....	28
2.1.2. Preparazione delle cellule NK <i>resting</i> e NK attivate.....	29
2.2. Linee cellulari.....	30
2.3. Anticorpi e reagenti.....	30
2.4. Citofluorimetria a flusso.....	32
2.4.1. Saggio di citotossicità (redirected killing assay).....	33

2.4.2. Quantificazione dei coniugati effettori-target.....	34
2.5. Microscopia confocale a scansione laser (CLSM).....	35
2.6. Saggio di attività enzimatica della PC-PLC.....	36
2.7. Preparazione di microdomini di membrana.....	38
2.8. Immunoprecipitazione, SDS-PAGE e Western blotting.....	38
2.9. Saggio di attività della sfingomielin sintasi (SMS).....	40
3. RISULTATI.....	42
3.1. Endocitosi anticorpo-mediata del recettore CD16 espresso sulla membrana delle cellule NK.....	42
3.2. Specificità dell'anticorpo anti-PC-PLC.....	47
3.3. Ruolo dell'enzima PC-PLC nella regolazione dell'espressione in membrana del recettore CD16.....	49
3.4. Localizzazione dell'enzima PC-PLC e del recettore CD16 nei microdomini di membrana delle cellule NK.....	51

3.5. Effetto specifico del D609 sulla down-modulazione dalla membrana plasmatica del recettore CD16.....	52
3.6. Ruolo funzionale dell'enzima PC-PLC nei meccanismi litici CD16-mediati.....	53
3.7. L'inibizione dell'enzima PC-PLC non ha effetto sulla formazione dei coniugati tra cellule NK e cellule bersaglio.....	55
3.8. Attività enzimatica della PC-PLC e della sfingomielin sintasi (SMS) dopo stimolazione del recettore CD16.....	56
4. DISCUSSIONE.....	60
5. BIBLIOGRAFIA.....	67

1. INTRODUZIONE

Il sistema immunitario costituisce un disegno dell'evoluzione estremamente specializzato e complesso, il cui principale ruolo fisiologico è quello di proteggere l'organismo dall'attacco di agenti estranei (virus, batteri, funghi, parassiti, etc.).

La difesa nei confronti dei microbi poggia su risposte precoci mediate dall'immunità innata, o naturale, e su risposte più tardive mediate dall'immunità specifica. Queste, interagendo tra loro, creano un "network" cellulare e molecolare altamente diversificato ed ottimizzato all'eliminazione dei diversi patogeni.

In particolare, il sistema immunitario di tipo specifico, rappresentato dai linfociti T e B, distingue e discrimina ciò che è proprio dell'organismo (self) da ciò che è estraneo (non-self), colpendolo selettivamente, ed è capace di memorizzare gli incontri con gli antigeni infettivi in modo da dare una risposta più rapida ed efficace ad ogni successiva riesposizione.

Il sistema immune naturale ha la doppia caratteristica di non essere rivolto contro un particolare agente estraneo ma di essere aspecifico ed attivo sin dalla nascita e, inoltre, non mostra alcuna memoria immunologica. Esso costituisce la prima linea difensiva dell'organismo e, qualora questa venga superata, è in grado di indurre il sistema immune specifico.

I principali componenti dell'immunità innata sono costituiti dalle barriere fisico-chimiche dell'organismo (epiteli e

membrane mucose), dalle molecole solubili (tra cui interleuchine, interferoni, proteine circolanti del sistema del complemento, fattori di necrosi tumorale), da diversi tipi cellulari, tra cui spiccano cellule ad attività fagocitica (neutrofili e macrofagi) e cellule ad attività citotossica naturale (Natural Killer, NK).

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di ampliare le conoscenze sulla biologia delle cellule linfocitarie NK, protagoniste dell'immunità innata grazie alla loro capacità di lisare cellule bersaglio in assenza di una precedente stimolazione e in modo non ristretto al complesso maggiore di istocompatibilità. L'attività citotossica delle cellule NK si esplica mediante l'esocitosi di granuli litici ed il rilascio di citochine, due eventi che rappresentano il risultato finale di un meccanismo di trasduzione del segnale che coinvolge numerose molecole, solo in parte note, tra cui tirosin-chinasi, GTPasi, fosfatasi e fosfolipasi.

In particolare, in questa tesi l'attenzione è stata rivolta sull'enzima fosfolipasi C (PC-PLC), specifico del ciclo della fosfatidilcolina (PC), che oltre ad essere un enzima chiave nel ciclo della PC e nelle risposte cellulari a lungo termine, sembrerebbe essere fortemente coinvolto nell'attività immunocitolitica.

In questo lavoro si è dimostrato che l'enzima PC-PLC regola in modo specifico l'espressione del recettore CD16 sulla membrana plasmatica delle cellule NK e che potrebbe essere coinvolto nei primi *steps* della cascata di trasduzione del segnale

innescata dall'ingaggio del recettore stesso, nonché nei meccanismi litici CD16-mediati.

1. 1. Le cellule Natural Killer umane

Le cellule NK sono le principali cellule effettrici dell'immunità innata ed hanno un ruolo ben stabilito nel rigetto tumorale in una varietà di modelli con tumore spontaneo o indotto e nelle infezioni virali e batteriche.

Costituiscono una sottopopolazione linfocitaria di piccole dimensioni, caratterizzata da numerosi granuli citoplasmatici, che rappresenta il 5–20% dei linfociti totali presenti nella circolazione periferica e nei tessuti linfoidei, specialmente a livello della milza (Trinchieri, 1989).

Non sono ancora note con certezza le origini differenziative di queste cellule, negli ultimi anni gli studi condotti hanno portato ad una visione più dettagliata. Le NK derivano da precursori midollari CD34⁺ e la loro maturazione necessita di citochine, tra cui IL-15 (Mingari et al., 1991) ed IL-21 (Sivori et al., 2003), nonché IL-2 (Ferlazzo et al., 2004) che consentono loro di esprimere i recettori attivatori e di divenire citolitiche. Sebbene condividano con i linfociti T un precursore comune, distinto da quelli che danno origine ai linfociti B ed ai granulociti/macrofagi (Rodewald et al., 1992), non esprimono recettori antigenici distribuiti clonalmente e generati per riarrangiamento genico nella linea somatica, come le immunoglobuline dei linfociti B o il complesso TCR dei linfociti T. Presumibilmente, la maturazione della linea cellulare delle NK è data dall'ambiente midollare con cui si trovano a contatto (Moretta et al., 2002) e la completa differenziazione

potrebbe avvenire negli organi linfoidei, come tonsille e linfonodi (Ferlazzo et al., 2004).

Il principale ruolo fisiologico delle cellule NK è la difesa dell'ospite nei confronti di alcune infezioni da virus e da patogeni intracellulari. Esse sono in grado di riconoscere una grande varietà di cellule bersaglio, tra cui anche cellule neoplastiche e cellule normali (Trinchieri, 1989) e di lisarle mediante l'attivazione del macchinario citolitico, in assenza di una precedente stimolazione e in modo non ristretto dal complesso maggiore di istocompatibilità (Lanier et al. 1985). Per questo motivo svolgono un ruolo fondamentale nell'immuno-sorveglianza (Burnet, 1970; Thomas, 1982) come cellule che intervengono nelle prime fasi della trasformazione tumorale ed impediscono crescita e invasività della massa neoplastica (Dunn et al., 2002). L'attivazione può anche avvenire tramite fattori solubili come citochine, immunocomplessi ed immunoglobuline.

Pertanto, le cellule NK svolgono un ruolo essenziale nella risposta immune innata e, allo stesso tempo, costituiscono l'anello di congiunzione con la risposta specifica perché in grado di produrre citochine e chemochine, la cui funzione è quella di attivare e stimolare la proliferazione delle cellule appartenenti al sistema immunitario acquisito. Tra le molecole di varia natura secrete dalle NK si possono rilevare: interferon- γ (IFN- γ), interleuchina-2 (IL-2), il fattore stimolante la crescita di colonie granulocitiche-macrofagiche (GM-CSF), il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), il fattore stimolante la crescita di

colonie macrofagiche (M-CSF), interleuchina-3 (IL-3), interleuchina-8 (IL-8).

1. 1. 2. Marcatori fenotipici di membrana

La sottopopolazione delle cellule NK, presenta numerose proteine sulla membrana citoplasmatica che possono essere usate come marcatori fenotipici per poter distinguere questa popolazione linfocitaria dalle altre, funzionalmente differenti.

In particolare, sulla membrana cellulare delle NK sono presenti due principali marcatori fenotipici: il CD16 e il CD56.

Il CD56 ha un peso molecolare compreso tra i 175 e i 220 kDa, è omologo alla molecola di adesione delle cellule neurali N-CAM (Lanier et al., 1991) e appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline, per cui è caratterizzato da un dominio immunoglobulinico nella porzione extra-cellulare. Il CD56 non sembra partecipare direttamente all'attivazione del macchinario citolitico delle NK, perché non è in grado di trasdurre un segnale di tipo attivatorio, la sua funzione si esplica mediante una maggiore adesione tra la cellula NK e il suo target (Lanier et al., 1991), tra cui anche linee tumorali CD56⁺ (Nitta et al., 1989).

Il CD16 è il recettore a bassa affinità per il frammento Fc delle immunoglobuline di classe G, anche chiamato FcR γ IIIa, è stato identificato grazie ad un gruppo di anticorpi monoclonali, tra cui il primo ad essere isolato è stato il B73.1 (Perussia et al., 1983a-b). E' il principale recettore responsabile della

citotossicità anticorpo-dipendente (ADCC), fenomeno esclusivo delle cellule NK (Stewart et al., 2006). E' una glicoproteina transmembrana di 70 kDa appartenente anch'essa alla superfamiglia delle Ig (Ravetch et al., 1989) e risulta essere espresso anche in altri tipi cellulari quali macrofagi (Perussia et al., 1991), neutrofili e in una sottopopolazione di linfociti T (Lanier et al., 1985).

In base alla densità di espressione delle molecole CD56 e CD16, sono state descritte due sottopopolazioni NK (Figura 1), morfologicamente e funzionalmente distinte (Cooper et al., 2001, Bryceson et al., 2006a). La maggior parte delle cellule NK circolanti nel sangue periferico (90%) esprime moderati livelli di CD56 e alti livelli di CD16 (CD56^{low}CD16^{bright}). Al contrario, la sottopopolazione minore, per lo più presente a livello degli organi linfoidi secondari, presenta alti livelli di CD56 e tende a perdere l'espressione del CD16 (CD56^{bright}CD16^{low/-}), mantenendo il solo recettore NKG2D con funzione attivatoria e il NKG2A-CD94 come recettore inibitorio. Queste due sottopopolazioni, oltre a differire nei livelli di espressione dei recettori inibitori e attivatori, recettori chemochinici e molecole di adesione (Campbell et al., 2001), mostrano importanti differenze funzionali. Le cellule CD56^{dim}CD16^{bright} hanno, infatti, un'elevata attività citotossica naturale, mentre le cellule CD56^{bright}CD16^{low/-} hanno una maggiore capacità di produrre citochine pro-infiammatorie, quali interferon (IFN)- γ , fattore di necrosi tumorale (TNF)- α , interleuchine (IL)-5, IL-10 e IL-13, svolgendo sostanzialmente una funzione di tipo

immunoregolatorio (Cooper et al., 2001; Jacobs et al., 2001; Martin-Fontecha et al., 2004). Inoltre, solo la piccola percentuale di queste cellule che circola nel sangue esprime i recettori attivatori chiamati collettivamente NCRs (NKp30, NKp46) ed è stato dimostrato, che in seguito ad esposizione all'IL-2 le cellule NK $CD56^{bright}CD16^{low/-}$ sono in grado di produrre perforina, acquisendo così capacità citolitica paragonabile, se non addirittura superiore, a quella delle cellule $CD56^{dim}CD16^{bright}$ (Ferlazzo et al., 2004).

Più recentemente, Fan et al. (2007) hanno identificato altre due sottopopolazioni NK, $CD56^{dim}CD16^{-}$ e $CD56^{bright}CD16^{bright}$, sulla base della densità di espressione sulla membrana plasmatica delle molecole CD56 e CD16. Questi due subsets, farebbero parte del 10% di cellule NK presenti soprattutto a livello degli organi linfoidi secondari, ed hanno differenti caratteristiche. Le cellule $CD56^{dim}CD16^{-}$ sono in grado di produrre alti livelli di citochine immunoregolatorie; mentre le cellule $CD56^{bright}CD16^{bright}$ sembrerebbero avere un elevato potenziale citotossico nei confronti di cellule bersaglio NK-sensibili (Fan et al., 2007).

1. 1. 3. Recettori attivatori ed inibitori

La funzione effettrice delle cellule Natural Killer è regolata dal delicato bilanciamento di segnali positivi e di segnali negativi generati da recettori di membrana di differente natura.

Le cellule autologhe normali presentano tutte in superficie molecole MHC di classe I e mediante il riconoscimento da parte di recettori inibitori specifici presenti sulle NK, vengono identificate come “self”, impedendo l’attivazione del macchinario citolitico e prevenendo così la loro stessa lisi (Yokoyama & Kim, 2006).

Questi recettori ad azione inibitoria possono essere suddivisi in due classi strutturali principali: la famiglia dei KIRs (Killer Inhibitory Receptors) e LIRs (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor-1) appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline e i recettori appartenenti alla famiglia delle Lectine di tipo C (CD94/NKG2A-C, Ly49 nel topo).

Il gruppo dei KIRs è caratterizzato dalla presenza di due o tre domini Ig-like nella porzione extracitoplasmatica, essi sono in grado di riconoscere specificamente in modo specifico il gruppo degli alleli HLA-A, -B e -C (Pende et al., 1996). La cascata di trasduzione del segnale viene innescata a livello di una sequenza amminoacidica chiamata ITIM, presente sulla coda citoplasmatica di questi recettori. Non appena il ligando specifico viene riconosciuto, si ha la fosforilazione di un residuo di tirosina, il reclutamento e l’attivazione di una fosfatasi (SHP-1) con conseguente inibizione del segnale attivatorio che, altrimenti, porterebbe alla lisi della cellula bersaglio (Burshtyn et al., 1996; Campbell et al., 1996).

La famiglia dei LIRs è piuttosto ampia e distribuita anche in altri tipi cellulari, tra cui i linfociti B, le cellule dendritiche e alcuni linfociti T (Fanger et al., 1999). Questi recettori sono in grado di

riconoscere una grande varietà di molecole MHC-I, la loro struttura è molto simile a quella dei KIRs, possiedono sequenze inibitorie ITIM e, presumibilmente, agiscono con gli stessi meccanismi (Fanger et al., 1998).

Tra i recettori eterodimerici della superfamiglia delle lectine di tipo C, il complesso recettoriale CD94/NKG2A riconosce in modo specifico l'allele HLA-E, una molecola MHC di classe I "non classica", espressa nella quasi totalità delle cellule autologhe normali, che si lega ai peptidi derivati dalla degradazione delle sequenze segnale degli alleli HLA-A, HLA-B e HLA-C (Braud et al., 1998; Borrego et al., 1998). Sembra che il legame di HLA-E con il recettore eterodimerico CD94/NKG2A sia un sensibile meccanismo evoluto per immunosorvegliare la normale biosintesi delle molecole HLA-I, in modo da prevenire la "self-reattività" contro cellule normali (Lopez-Botet et al., 2000). La subunità CD94 del recettore è invariante e codificata da un singolo gene (Chang et al., 1995). Al contrario, NKG2 rappresenta una famiglia multigenica composta da cinque proteine che differiscono tra loro (NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2D, NKG2E), associate al CD94 mediante un ponte disolfuro. Le isoforme ad azione inibitoria sono le NKG2A/B contenenti la sequenza ITIM in grado di innescare la cascata di trasduzione che si conclude con il blocco dell'attivazione della cellula NK (LeDrean et al., 1998).

L'isoforma NKG2D mostra una minima identità di sequenza con le altre (20%-30%) e non si lega alla subunità CD94. Questo recettore riconosce molecole omologhe all'MHC-I, MICA e

MICB, espresse in piccola parte nei tessuti normali ma upregolate in cellule sottoposte a stress o a trasformazione neoplastica (Bauer et al., 1999; Pende et al., 2001). Questa peculiarità rende l'NKG2D un recettore con funzione attivatoria che, per poter esplicare la sua attività citolitica, ha bisogno dell'associazione con una molecola adattatrice DAP10. Il dominio citoplasmatico di questa molecola, dopo fosforilazione su un residuo di tirosina, recluta una subunità della PI3K ed innesca le funzioni effettrici delle cellule NK (Wu et al., 1999).

I segnali positivi che portano all'attivazione delle cellule NK possono derivare da molecole co-stimolatorie o da molecole di adesione, piuttosto che da un unico recettore, tra cui CD2, CD11a/CD18 (LFA-1), CD69 (Moretta et al., 2001). Tra i recettori responsabili dell'induzione delle cellule NK il gruppo principale è costituito dagli NCRs (Natural Cytotoxicity Receptors), che agiscono nella citotossicità naturale.

Il primo ad essere stato identificato è NKp46 (Sivori et al., 1997), espresso esclusivamente sulle cellule NK sia *resting* che attivate. In seguito all'ingaggio di questo recettore con il suo ligando (non ancora noto), si ha una mobilitazione del Ca^{2+} dai depositi intracellulari, il rilascio dei granuli litici, con conseguente lisi della cellula bersaglio, e il rilascio di citochine. Da un punto di vista biochimico, NKp46 è una glicoproteina transmembrana, di circa 46 kDa, appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline e caratterizzata da due domini Ig-simili di tipo C2 nella porzione extracellulare, seguiti da una sequenza amminoacidica che li connette con la porzione transmembrana e

con quella citoplasmatica (Pessino et al., 1998). Quest'ultima non possiede sequenze tipicamente coinvolte nell'attivazione della cascata del segnale, come le ITAM, presumibilmente le code intracitoplasmatiche dei recettori NKp46 sono associate con proteine adattatrici contenenti tali sequenze.

Il recettore NKp44 viene espresso solo dalle cellule NK attivate con IL-2 (Vitale et al., 1998), appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline (Cantoni et al., 1999) ed è caratterizzata da un singolo dominio extracellulare di tipo V e da una porzione prossimale alla membrana ricca di residui di prolina, serina e treonina. Come gli altri recettori attivatori, NKp44 ha nella regione transmembrana un amminoacido carico positivamente (Lys), coinvolto nell'associazione con polipeptidi in grado di trasdurre il segnale, perché dotati della sequenza ITAM. Infatti, NKp44 è associato ad una molecola adattatrice costituita dal dimero KARAP/DAP12, che subisce fosforilazione, su un residuo di tirosina, a seguito dell'ingaggio del recettore (Vitale et al., 1998; Cantoni et al., 1999).

L'ultimo recettore appartenente al gruppo degli NCRs ad essere stato scoperto è NKp30 (Pende et al., 1999), è considerato una molecola aggiuntiva, in quanto coopera con NKp46 e NKp44 nell'induzione della citotossicità contro diversi bersagli tumorali. NKp30 è espresso sia dalle cellule NK *resting* che da quelle attivate, appartiene anch'esso alla superfamiglia delle immunoglobuline e, nonostante svolga un ruolo addizionale, ha una struttura distinta da quella di NKp46 e NKp44, infatti, è associato alla catena ζ del complesso CD3. Inoltre, presenta

nella regione extracellulare un singolo dominio Ig di tipo V e un residuo amminoacidico carico nella porzione transmembrana (Pende et al., 1999).

Riepilogando, la citolisi è inibita quando appropriate molecole MHC-I sono espresse dalle cellule bersaglio, ma viene incrementata quando si verifica l'ipotesi del "missing self" (Ljunggren & Karre, 1990), vale a dire quando le NK non sono in grado di riconoscere come "self" le cellule target, perché sprovviste delle molecole MHC di classe I, e si attivano, lisandole. Con l'aiuto di questo peculiare meccanismo le cellule che hanno perso la normale espressione dell'MHC-I, cellule tumorali o infettate da virus, diventano incapaci di inviare segnali inibitori alle cellule NK e, di conseguenza, diventano suscettibili alla lisi.

1. 1. 4. Il recettore CD16 e i meccanismi litici CD16-mediati

Uno dei recettori attivatori maggiormente caratterizzati delle cellule NK è il CD16, una proteina transmembrana altamente glicosilata (40- 65 kD), associata in modo non covalente, oltre che alla catena γ , alla catena ζ del complesso CD3 (Anderson et al., 1990), la stessa presente nel TCR dei linfociti T. La porzione intracitoplasmatica del CD16 è caratterizzata da una sequenza amminoacidica di circa 26 basi denominata ITAM

(Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs), che è in grado di trasdurre un segnale attivatorio (O' Shea et al., 1991).

In particolare, il cross-linking del CD16 (Figura 2) con il suo ligando porta ad una rapida stimolazione della protein-tirosin-chinasi PTK cui segue la fosforilazione di un residuo di tirosina della sequenza ITAM sulla catena ζ . Successivamente, vengono reclutate su questo sito fosforilato le PTK appartenenti alla famiglia Syk (Brumbaugh et al., 1997) e alla famiglia Src (Azzoni et al., 1992) e la proteina adattatrice LAT (Jevremovic et al., 1999). Questi elementi essenziali nella cascata di trasduzione del segnale vengono, in un secondo momento, legati dall'ubiquitina e degradati a livello del proteasoma, in modo da attenuare la propagazione del segnale intracellulare, iniziato dall'ingaggio del recettore con il suo specifico ligando, e porre fine all'attivazione della cellula NK (Paolini et al., 2001).

Come conseguenza della fosforilazione e del legame di specifiche molecole sulla porzione intracitoplasmatica del recettore, possono verificarsi differenti eventi metabolici: da una parte vengono attivate le fosfolipasi C- γ 1 e C- γ 2 (specifiche del ciclo dei fosfoinositidi) che, a loro volta, portano all'attivazione della protein-chinasi C (PKC), mediante la produzione di diacilglicerolo (DAG) come secondo messaggero, e ad un aumento transiente della concentrazione intracellulare del Ca^{2+} , dovuta all'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP_3) (Einspahr et al., 1991; Ting et al., 1992). Un differente pathway coinvolge le proteine Vav-Rac1 (Galandrini et al., 1999); un'altra via vede

l'attivazione della fosfatidilinositol-3-chinasi (PI3K) (Weiss & Littman, 1993).

La PI3K gioca un ruolo fondamentale esclusivamente nella citotossicità anticorpo-dipendente (ADCC), è stato dimostrato che il metabolita fungino wortmannina si lega irreversibilmente ad una delle subunità catalitiche della PI3K impedendole di inviare il segnale per la lisi della cellula bersaglio e bloccando, di conseguenza, l'ADCC. Al contrario, è stato dimostrato che la citotossicità naturale dipende dall'attivazione della PTK ma non da quella della PI3K (Bonnema et al., 1994).

Alla luce di queste osservazioni si deduce che le vie di trasduzione del segnale per la citotossicità naturale e per quella anticorpo-dipendente sono distinte.

I fenomeni dell'ADCC e del "redirected killing" anticorpo-mediato sono esclusivi delle cellule NK (Stewart et al., 2006; Galandrini et al., 1994) le quali risultano in grado di lisare efficientemente cellule bersaglio, poiché il legame con la cellula target e la successiva attivazione del macchinario litico dipendono dalla presenza del recettore CD16 (Figura 3). (Perussia et al., 1984; Werfel et al., 1989).

La citotossicità anticorpo-dipendente rappresenta un importante link tra i meccanismi dell'immunità specifica, caratterizzati dalla produzione di anticorpi da parte dei linfociti B, e quelli dell'immunità innata, mediati dalle cellule Natural Killer.

Gli eventi che contraddistinguono l'ADCC e i meccanismi litici CD16-mediati possono essere così schematizzati:

- Legame della porzione $F(ab')_2$ dell'IgG ad un antigene presente sulla membrana della cellula bersaglio o legame della porzione $F(ab')_2$ dell'Ab anti-CD16 al recettore presente sulla membrana della cellula effettrice;
- Riconoscimento del frammento Fc integro dell'IgG da parte del recettore CD16 proprio della cellula NK o riconoscimento del frammento Fc integro dell'Ab anti-CD16 da parte dell' $Fc\gamma R$ presente sulla cellula bersaglio;
- Induzione della cascata del segnale attivatorio nella cellula NK, che si traduce nell'esocitosi dei granuli litici e nel rilascio del loro contenuto nella zona di contatto tra cellula effettrice e cellula bersaglio (Henkart & Yue, 1988);
- Morte della cellula bersaglio come conseguenza della lisi per osmosi o per l'attivazione dell'apoptosi (Trapani & Smith 2002).

In particolare, le proteine citotossiche contenute nei granuli sono rappresentate da perforina, granzimes e proteoglicani.

La perforina è sintetizzata come un precursore inattivo di 70 kDa (Lichtenheld et al., 1988) che viene attivato, durante la sua biosintesi, mediante taglio proteolitico all'interno di un compartimento acido (Uellner et al., 1997). La porzione centrale della molecola contiene una regione di circa 300 amminoacidi omologa a quella presente in C9, componente del sistema del complemento, per cui la perforina potrebbe essere coinvolta nella formazione del poro sulla cellula bersaglio. La presenza dei proteoglicani all'interno dei granuli litici mantiene la

perforina in uno stadio inattivo, non appena si verifica la secrezione delle proteine citotossiche, come conseguenza dell'aumento della concentrazione del Ca^{2+} e del pH, i proteoglicani liberano la perforina che può inserirsi nella membrana plasmatica della cellula bersaglio (Masson et al., 1990) dove la fosfocolina, testa polare della fosfatidilcolina, agisce come specifico recettore Ca^{+2} -dipendente per le molecole di perforina (Tschopp et al., 1989).

Dopo l'inserzione si ha la polimerizzazione delle singole molecole di perforina, con la conseguente formazione di pori non ionicamente selettivi di diametro variabile (10-20 nm), attraverso cui si verifica un flusso di piccoli ioni e di altri soluti, che causano rapidamente lisi da collasso osmotico (Berke, 1994).

I granzymes costituiscono una famiglia di serin proteasi, tra cui solo il granzyme B sembrerebbe essere coinvolto nell'apoptosi della cellula bersaglio. Una volta all'interno di questa attiva la cascata delle caspasi, inducendo la frammentazione del DNA e la seguente morte cellulare (Oshimi et al., 1996).

Una volta che la cellula NK ha svolto la sua funzione effettrice, deve essere riattivata da citochine presenti nell'ambiente, che le consentono di recuperare la capacità di lisare altre cellule bersaglio (Berke, 1994).

All'interno dei granuli litici si trova anche una proteasi lisosomiale, la catepsina B, importante nel controllo dell'attività citolitica. Questa molecola, infatti, viene sequestrata sulla membrana della cellula NK, dopo l'esocitosi dei granuli, e

inattiva la perforina che potrebbe diffondere indietro, causando la lisi della stessa cellula effettrice (Balaji et al., 2002).

1.2. Le fosfolipasi

Le fosfolipasi sono enzimi capaci di idrolizzare i legami fosfodiesterici dei fosfolipidi, presenti in alte concentrazioni nei succhi intestinali, nelle secrezioni batteriche e nei veleni di origine animale. All'interno della cellula questi enzimi possono essere attivati a seguito di stimolazione recettoriale e idrolizzare i fosfolipidi di membrana, generando molecole coinvolte nella trasduzione del segnale o loro precursori immediati. In base alla posizione in cui viene effettuato il taglio catalitico del substrato fosfolipidico, possono essere identificate differenti fosfolipasi (Figura 4).

Uno dei fosfolipidi di membrana più studiati, soggetto all'azione catalitica delle fosfolipasi di tipo C (PI-plc) è il fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (PIP₂).

L'attivazione specifica della PI-plc deriva dall'interazione tra un recettore sulla superficie cellulare e una molecola implicata nella comunicazione cellula-cellula, come ormoni, fattori di crescita, neurotrasmettitori. La PI-plc è un enzima Ca²⁺-dipendente e, in particolare, idrolizza il legame fosfodiesterico che unisce l'inositolo fosforilato al glicerolo acilato. Come conseguenza di questa scissione vengono prodotti due importanti messaggeri: inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerolo (DAG). Il primo

diffonde all'interno della cellula, raggiunge la superficie del reticolo endoplasmatico e provoca il rilascio di ioni Ca^{2+} dai depositi nell'ambiente citoplasmatico. Subito dopo, la maggior parte dell' IP_3 viene idrolizzato in una forma inattiva (inositolo 1,4-bisfosfato), non più in grado di indurre il rilascio del Ca^{2+} . Contemporaneamente, una chinasi specifica fosforila una piccola quantità dell' IP_3 , il prodotto (inositolo 1,3,4,5-tetrafosfato) ristabilisce un trasporto di ioni Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare verso l'interno. Raggiunto un equilibrio viene defosforilato e reso inattivo.

Il diacilglicerolo (DAG), a differenza dell' IP_3 , non diffonde all'interno del citoplasma, ma rimane nel doppio strato fosfolipidico della membrana. La sua principale funzione è quella di attivare una famiglia di protein-chinasi, le PKC. Queste proteine mediano un'ampia gamma di risposte cellulari, tra cui la fosforilazione di residui di serina o treonina presenti su numerose molecole bersaglio coinvolte nella cascata di trasduzione del segnale (Berridge & Irvine, 1989; Rhee & Bae, 1997).

E' stato dimostrato come l'attivazione delle PI-plc rappresenta un evento fondamentale per l'induzione del segnale attivatorio nelle cellule Natural Killer (Steele & Brami. 1988; Chow et al., 1988). L'isozima $\text{plc-}\gamma 2$, presente nelle NK, viene fosforilato in seguito al riconoscimento di una cellula tumorale ed innesca la risposta citotossica (Whalen et al., 1993). Inoltre, nella citotossicità anticorpo-dipendente (ADCC) sono i due isozimi $\text{plc-}\gamma 1$ e $\text{plc-}\gamma 2$ ad essere fosforilati dopo l'ingaggio del CD16

con il suo specifico ligando e ad innescare la cascata di segnali biochimici che porta all'esocitosi dei granuli litici (Einspahr et al., 1991; Ting et al., 1992).

L'altro fosfolipide maggiormente espresso sul foglietto esterno della membrana plasmatica delle cellule eucariotiche, è la fosfatidilcolina (PC), che subisce idrolisi da parte delle fosfolipasi di tipo PLD, PLA₂ e PLC (PC-PLC).

Il ciclo della PC (Figura 5), che rappresenta per la cellula la più importante fonte di DAG, diverso per composizione acilica da quello formato per azione della PI-PLC (Pelech & Vance, 1989). Il DAG, infatti, può essere generato direttamente dall'azione della PC-PLC (che libera anche fosfocolina, PCho) oppure indirettamente dall'enzima PLD, che genera colina (Cho) e acido fosfatidico, successivamente defosforilato a DAG per azione dell'enzima fosfatidato fosfoidrolasi (Liscovitch et al., 2000; Exton 2002).

Nella cellula, il ciclo della PC viene stimolato in risposta a numerosi agonisti quali ormoni, neurotrasmettitori, fattori di crescita (PDGF, EGF, HGF), citochine (IL-1, TNF, IL-3, CSF-1, IFNs), prostaglandine, componenti del complemento e altri segnali extracellulari (Exton, 1994).

Numerose evidenze sperimentali dimostrano il coinvolgimento degli enzimi PLD, la PLD₁ e la PLD₂, nei *pathway* della trasduzione del segnale che regolano un'ampia gamma di processi fisiologici. Tali processi includono il traffico costitutivo delle vescicole dal reticolo endoplasmatico al *trans network Golgi*, la riorganizzazione del citoscheletro, la mitogenesi, la

fagocitosi (Siddhanta & Shields 1998; Brown et al., 1998; Colley et al., 1997; Rizzo et al., 1999; Kusner et al., 1999). È stato riportato il coinvolgimento della PLD anche nelle funzioni effettrici delle cellule NK. In particolare, si è visto che i secondi messaggeri che vengono prodotti dalla sua azione (PA e cho) intervengono nella biosintesi e nella secrezione del TNF α (Balboa et al., 1992), nonché nell'esocitosi dei granuli litici innescata dal CD16 nell'ADCC (Milella et al., 1999).

Molto ben studiato è anche l'enzima PLA₂, che catalizza l'idrolisi della PC in acidi grassi e lisofosfolipidi (Glaser et al., 1993; Schaloske & Dennis, 2006), conosciuta principalmente per la sua capacità di liberare acido arachidonico, importante nella regolazione dei processi immuni e infiammatori (Yedgar S et al., 2006). Ad oggi sono stati caratterizzati cinque distinti tipi di enzimi PLA₂: l'isoforma secretoria (sPLA₂) a basso peso molecolare, la citosolica (cPLA₂) ad alto peso molecolare, la Ca²⁺ indipendente (iPLA₂), l'acetilidrolasi del fattore attivante le piastrine (PAF-AH), e l'isoforma lisosomiale (Schaloske & Dennis, 2006).

Nelle cellule NK sono richieste sia l'attivazione della PLA₂ che il rilascio di AA per espletare le funzioni citotossiche (Deem et al., 1987; Cifone et al., 1997). L'ingaggio del recettore CD16 induce l'attivazione di entrambe le isoforme della PLA₂, sia la citosolica che la secretoria (Milella et al., 1997). I leucotrieni e gli altri prodotti derivati incrementano il riconoscimento della cellula bersaglio ed ottimizzano l'attività litica. Inoltre, è stato dimostrato che la PC-PLD controlla l'attivazione dell'isoforma

secretoria della PLA₂ (Milella et al., 1999) e che la sua secrezione avviene contemporaneamente all'esocitosi dei granuli litici (Milella et al., 1997).

1.2.1. La fosfolipasi C specifica per fosfatidilcolina (PC-PLC).

La PC-PLC (isolata per la prima volta da *Bacillus cereus*, Johansen et al., 1988) è l'enzima più importante del ciclo della PC, responsabile della produzione di DAG e PCho, ma è anche la fosfolipasi meno conosciuta nelle cellule di mammifero. Nel passato sono stati isolati, clonati e caratterizzati numerosi enzimi PC-PLC procariotici, ma nessuna isoforma PC-PLC è stata mai clonata da cellule di mammifero. Tuttavia, ad oggi, c'è un numero sempre maggiore di evidenze sperimentali che dimostrano la presenza di isoforme PC-PLC in cellule di mammifero normali e mature o tumorali. In particolare, nei fibroblasti murini 3T3 è stata individuata una isoforma di 66kDa (Podo et al., 1996), nelle cellule della linea istiocitica U937 è stato descritto un enzima di 40 kDa (Clark et al., 1986), nel plasma del bulbo seminale sono state trovate due forme di PC-PLC di 55 e 69 kDa (Sheiknejad & Srivastava, 1986) mentre nei miociti cardiaci una isoforma di 28 kDa (Wolf & Gross, 1985), nelle cellule Natural Killer sono state osservate due isoforme di peso molecolare differente (40 e 66 kDa) (Ramoni et al., 2001, 2004; Spadaro et al., 2006). Al momento non si conosce il

motivo all'origine di questa discrepanza tra le varie isoforme, potrebbe trattarsi di un evento di splicing alternativo a partire da un unico precursore o dell'associazione con altre proteine a far sì che, nelle differenti linee cellulari, siano presenti PC-PLC di diverso peso molecolare.

In generale, gli agonisti che inducono l'idrolisi della PC promuovono anche l'idrolisi del PIP_2 nelle loro cellule bersaglio. In risposta a specifici ligandi, molte cellule come i neutrofili (Billah et al., 1989), gli epatociti (Exton, 1990), i fibroblasti (Pessin et al., 1990) e i mastociti (Kennerly, 1990) producono, pertanto, DAG in modo "bifasico" con un picco iniziale, rapido e transiente, associato all'aumento di IP_3 e Ca^{+2} citosolico seguito da un più lento, ma prolungato accumulo (Figura 6; Exton, 1990; Liscovitch, 1992). La fase più sostenuta è dovuta all'idrolisi della PC ed è associata all'aumento dei livelli di PCho. Questo accumulo di DAG, PC-PLC-dipendente, viene generato in risposta ad alcuni mitogeni, fattori di crescita, esteriferi del forbolo e risulta associato alla sintesi di DNA, dimostrando che questo secondo messaggero è necessario per sostenere le risposte a lungo termine quali la proliferazione, il differenziamento e l'attivazione cellulare (Larrodera et al., 1990).

Numerose evidenze sperimentali suggeriscono il coinvolgimento della PC-PLC nel controllo della normale crescita cellulare e nella trasformazione indotta da oncogeni come ras e src (Price et al., 1989; Lacal et al., 1987; Moscat et al., 1989; Podo et al., 1996). Il prodotto oncogenico ras (p21^{ras}), infatti, stimola

enorme l'idrolisi della fosfolipidasi, attraverso l'attivazione della PC-PLC, inducendo un forte incremento dei livelli di DAG e Pcho. Allo stesso modo, il fattore di crescita PDGF (platelet-derived growth factor) induce un aumento tardivo dell'attività dell'enzima, misurata come incremento dei livelli di Pcho intracellulari, nelle cellule 3T3 (Larrodera et al., 1990; Ramoni et al., 2004). Tutto ciò evidenzia un ruolo della PC-PLC nella proliferazione e nel differenziamento cellulare.

Oltre alla regolazione dei fenomeni di crescita cellulare, la PC-PLC potrebbe giocare un ruolo importante nei meccanismi citolitici. Nei macrofagi, il cross-linking del recettore Fc, presente sulla membrana plasmatica, attiva direttamente la PC-PLC. L'enzima, a sua volta, stimola la traslocazione del fattore di trascrizione NF- κ B dal citoplasma al nucleo, consentendo così la trascrizione del gene della sintetasi dell'ossido nitrico (iNOS) che innesca il burst ossidativo tipico della risposta immunitaria dei macrofagi contro agenti estranei (Lennartz, 1999). Ancora nei macrofagi, la PC-PLC viene attivata dal lipopolisaccaride (LPS) presente sulla parete cellulare di batteri gram-negativi, innescando così l'attività macrofagica (Grove et al., 1990). In particolare, la PC-PLC stimola la sfingomielinasi acida (aSMase) e il conseguente rilascio di ceramide porta all'attivazione delle protein-chinasi attivate da mitogeni (MAPK) necessarie per il rilascio di citochine immunoregatorie quali IL-1, IL-6 e TNF (Monick et al., 1999). Inoltre, la PC-PLC è coinvolta nella cascata di trasduzione del segnale innescata da vari recettori di membrana.

Ad esempio, a seguito del legame tra il fattore l stimolante la crescita delle colonie e il suo recettore (CSF1R), espresso sia sulla membrana dei macrofagi che su quella delle cellule NIH 3T3, si ha la fosforilazione di una proteina G, successivamente questa si associa con l'enzima PC-PLC portando ad un rapido incremento dei secondi messaggeri derivati dall'idrolisi della fosfocolina (Choudhury et al., 1991). Cuschieri et al. hanno recentemente dimostrato che la PC-PLC è responsabile dell'attivazione del segnale a seguito di ingaggio, da parte del LPS, del recettore CD14 espresso dai macrofagi (Cuschieri et al., 2006). Ed è stato anche riportato il coinvolgimento dell'enzima PC-PLC nella cascata di trasduzione del segnale mediata dal recettore CD38 che porta all'attivazione dei linfociti B (Moreno-García et al., 2005).

L'enzima PC-PLC sembra essere implicato nella secrezione di citochine, ed in particolare, nel trasporto dei lisosomi secretori contenenti IL-1 verso la periferia della cellula macrofagica. La PC-PLC, attivata dall'efflusso di ioni K^+ indotto dall'ATP, sarebbe responsabile dell'aumento delle concentrazioni di Ca^{+2} e della conseguente attivazione della PLA_2 richiesti per la secrezione finale della citochina nell'ambiente extracellulare (Andrei et al., 2004). La PC-PLC sembra importante non solo nella secrezione di citochine immunoregatorie, ma anche per l'espressione e la secrezione di chemochine implicate nei processi infiammatori, quali MCP-1 e CCL-2 (Goebeler et al., 2001; Durand et al., 2004). Recenti studi effettuati dal nostro gruppo hanno dimostrato come la PC-PLC sia coinvolta anche

nella secrezione della citochina CCL2 mediata dall'ingaggio del recettore CCR5 da parte della proteina HIV-1 gp120 (Fantuzzi et al., 2008).

Oltre a regolarne la secrezione, la PC-PLC sembra coinvolta anche nel *signalling* del TNF, poiché stimola la traslocazione del fattore NF- κ B nel nucleo della cellula, indotta dal legame del TNF con il recettore TR55 (Schutze et al., 1992).

Studi condotti nel nostro laboratorio, basati principalmente su analisi eseguite al microscopio confocale a scansione laser, hanno dimostrato la presenza dell'enzima PC-PLC nelle cellule Natural Killer umane, la sua distribuzione all'interno dei compartimenti cellulari (Golgi, reticolo endoplasmatico, centro di organizzazione dei microtubuli), nonché la sua co-localizzazione con i granuli litici, contenenti perforina. In dettaglio, è stato visto come l'enzima si distribuisca, in modo polarizzato, a livello della zona di contatto tra la cellula NK e il suo target e come svolga un ruolo funzionale nei meccanismi di citotossicità naturale (Ramoni et al., 2001).

Recentemente, studi condotti dal nostro gruppo hanno evidenziato l'esclusiva presenza dell'enzima PC-PLC sulla membrana delle cellule NK, tra tutte le sottopopolazioni linfocitarie del sangue periferico umano. In particolare, è stato possibile individuare un subset di NK con fenotipo PC-PLC^{bright} ed uno PC-PLC^{low/-}, che corrispondono ai due subsets precedentemente descritti da Cooper et al. (2001), per cui la nuova classificazione diventerebbe CD56^{low}CD16^{bright}PC-PLC^{bright} e CD56^{bright}CD16^{low/-}PC-PLC^{low/-}, rispettivamente.

Inoltre, è stata dimostrata una correlazione diretta tra i livelli di espressione in membrana della PC-PLC e quelli del recettore CD16, suggerendo un possibile coinvolgimento dell'enzima nell'acquisizione della capacità litica delle cellule NK, che si manifesta con l'aumento dei livelli di CD16 espressi sulla superficie cellulare (Spadaro et al., 2006).

2. MATERIALI E METODI

2.1. Preparazione delle cellule mononucleate e dei linfociti del sangue periferico umano

Le cellule mononucleate del sangue periferico umano (PBMC) sono state separate mediante centrifugazione su gradiente discontinuo di densità (Ficoll-Hystopaque-1077 (FH) Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (Boyum, 1968). Il sangue da buffy coats, (Centro trasfusionale del Policlinico Umberto I di Roma) è stato prima diluito 1:1 con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco Laboratories, Grand Island, NY) e poi stratificato lentamente, in tubi Falcon da 50 ml, su FH. Dopo centrifugazione a 400xg per 40 minuti alla temperatura di 20°C, si ha la formazione di un anello, nell'interfaccia tra FH e siero, costituito dalle cellule mononucleate. Successivamente, questo anello viene prelevato, sospeso in RPMI-1640 (Gibco Lab.) e centrifugato alla velocità di 400xg per 7 minuti, due ulteriori lavaggi con PBS-Dulbecco (Gibco Lab.) completano la preparazione del PBMC.

I linfociti del sangue periferico (PBL) sono stati ottenuti dopo aver fatto passare il PBMC su colonne di lana di nylon, al fine di rimuovere le cellule aderenti tra cui monoliti/macrofagi e cellule B (Julius et al., 1973). Dalla colonna i linfociti sono stati eluiti con terreno di coltura completo costituito da RPMI-1640 arricchito con il 10% di siero fetale bovino (FBS, Gibco Lab.),

precedentemente inattivato al calore (56°C), glutammina (2mM), penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 mg/ml) (Gibco Lab.).

2.1.2. Preparazione delle cellule NK resting e NK attivate (LAK)

I PBL freschi, ottenuti con il metodo descritto in precedenza, sono stati incubati per 30 minuti a 4°C sotto rotazione con una miscela di anticorpi monoclonali anti-CD3 (OKT3), anti-CD4 (OKT4), anti-CD8 (OKT8) e anti-CD14 (63D3). Dopo due lavaggi con RPMI freddo (Gibco Lab.), alla sospensione cellulare sono state aggiunte biglie magnetiche rivestite di anticorpi anti-Ig di topo (Oxoid Italiana S.p.A., Milano, Italia), e sono state incubate per 30 minuti a 4°C sotto rotazione. Successivamente, è stata eseguita una separazione immunomagnetica da cui il 93-98% delle cellule recuperate presentava un fenotipo CD3⁻, CD4⁻, CD8⁻, CD16⁺ e CD56⁺.

In alcuni esperimenti, le cellule NK così ottenute sono state attivate coltivando i PBL per 4 giorni con interleuchina-2 ricombinate umana (100 U/ml) (rIL-2, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany). Al termine della coltura, è stata eseguita una separazione utilizzando una miscela di anticorpi anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 e un'incubazione con biglie immunomagnetiche ricoperte da anticorpi anti-Ig di topo.

2.2. Linee cellulari

Le linee cellulari RPMI 8866 (linea linfoblastoide), gli ibridomi OKT3 (IgG2a, anti-CD3), OKT4 (IgG2, anti-CD4), OKT8 (IgG2, anti-CD8) e 63D3 (anti-CD14) sono stati forniti dalla società American Type Culture Collection (ATCC).

Gli ibridomi B73.1 e 3G8 (IgG1, anti-CD16) sono stati messi gentilmente a disposizione dal Dr. Giorgio Trinchieri (NIH, Bethesda, MD). La linea cellulare P815 (mastocitoma murino, FcR+) è stata cortesemente donata dalla Dr.ssa Angela Santoni (Dip. Medicina Sperimentale, Università di Roma “La Sapienza”).

Tutte le linee cellulari sono state seminate ad una densità compresa tra 1 e 4×10^5 cellule/ml in terreno di coltura e coltivate a 37°C in un incubatore umidificato al 5% di CO_2 e 95% di aria. Inoltre, tutte le colture sono risultate prive di micoplasma, come provato da ripetuti controlli effettuati mediante colorazione fluorescente per il DNA citoplasmatico (Hoechst, Sigma-Aldrich).

2.3. Anticorpi e reagenti

I seguenti anticorpi monoclonali sono stati usati in citofluorimetria a flusso e in microscopia confocale a scansione laser per identificare gli antigeni caratteristici del fenotipo delle cellule NK e quelli espressi dalle cellule di carcinoma

mammario: B73.1 e 3G8 (anti-CD16), OKT3, OKT4, OKT8 e 63D3 (anti-CD14); anti-CD16-FITC, anti-CD16-PE, anti-CD56-FITC, anti-CD3-FITC, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD25-FITC, anti-CD69-FITC, anti-CD71-FITC, anti-HLA-DR-FITC forniti dalla BD Biosciences (San Jose, CA).

Per gli studi eseguiti sull'enzima PC-PLC è stato utilizzato un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro la PC-PLC batterica (*Bacillus cereus*), cross-reattivo con la PC-PLC di mammifero, ottenuto con le procedure descritte da Clark et al. (1986), e da noi modificato e caratterizzato (Podo et al. (1996), Spadaro et al. (2006) e Ramoni et al. (2004).

Nelle analisi di Western blot sono stati utilizzati anche i seguenti anticorpi: anti-CD45 (BD Biosciences), anti-Lck (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California), IgG di capra anti topo (G α M) e IgG di capra anti coniglio (G α R) coniugate con la perossidasi (-HRP) (Sigma-Aldrich).

Inoltre, per le marcature indirette, sono stati utilizzati anticorpi secondari coniugati con fluorocromi, tutti forniti dalla Molecular Probes (Eugene, OR): frammenti F(ab')₂ di IgG di capra anti topo (G α M) coniugati con Alexa Fluor 488, -594, o -546, frammenti F(ab')₂ di IgG di capra anti coniglio (G α R) coniugati con Alexa Fluor 488 o -594.

Nel corso della sperimentazione sono stati utilizzati i seguenti reagenti: triciclodecano-9-yl-xantogenato (D609), sodio azide (NaN₃), PKH-67, Calceina AM e idroetidina (Sigma-Aldrich); cicloesimide (CHX), Jasplakinolide e falloidina coniugata con Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594 (Molecular Probes).

2.4. Citofluorimetria a flusso

Il fenotipo delle cellule NK è stato caratterizzato mediante immunofluorescenza diretta utilizzando anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi FITC o PE. Brevemente, le cellule sono state incubate (30 min, 4°C) con le appropriate diluizioni degli anticorpi, come specificato per ogni esperimento. Dopo ripetuti lavaggi l'intensità di fluorescenza dei singoli campioni è stata misurata su scala logaritmica utilizzando un citofluorimetro a flusso FACSCalibur (BD Biosciences).

L'espressione della PC-PLC sulle cellule NK è stata caratterizzata mediante marcature indirette usando l'anticorpo policlonale prodotto nel nostro laboratorio, seguito dall'incubazione con un anticorpo secondario coniugato con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes).

In alcuni esperimenti, le cellule NK sono state incubate con quantità saturanti di anti-CD16 (B73.1, 30 min, 4°C), seguite dall'anticorpo secondario GαM 488, e messe in coltura a 37°C per tempi variabili in presenza dell'inibitore dell'enzima PC-PLC (D609, 50 µg/ml), o dell'inibitore della sintesi proteica (CHX, 50 µg/ml); successivamente le cellule sono state analizzate al FACS. L'analisi statistica dei singoli campioni è basata sull'intensità media di fluorescenza (MFI) a cui è stato sottratto il valore del rispettivo controllo isotipico.

2.4.1. Saggio di citotossicità (Redirected killing assay)

L'attività citolitica delle cellule NK è stata misurata mediante citofluorimetria a flusso, misurando l'integrità della membrana plasmatica delle cellule bersaglio, come indicato dall'incorporazione di ioduro di propidio (PI) (Derby et al., 2001). I PBL e le cellule NK attivate con IL-2 sono state utilizzate come effettori, a vari rapporti, contro cellule bersaglio della linea di mastocitoma murino Fc γ R⁺ P815, precedentemente marcate con il colorante di membrana PKH-67 (Sigma-Aldrich). Le cellule effettrici sono state incubate con l'anticorpo anti-CD16 (B73.1) o con l'anti-CD335 (anti-NKp46, BAB 281) per 30 min a 4°C e, successivamente, sono state lavate per rimuovere l'eccesso di anticorpo. In alcuni esperimenti, le cellule effettrici sono state coltivate in presenza dell'inibitore D609 (50 μ g/ml per 40 min) prima dell'incubazione con i relativi anticorpi.

La sospensione cellulare contenente le cellule effettrici e quelle bersaglio è stata "pellettata" mediante una breve centrifugazione a 750 rpm per 5 min ed incubata a 37°C in presenza del 5% di CO₂ per 90 min. Infine, le cellule sono state bloccate in ghiaccio ed è stato aggiunto PI (2 μ g/ml) per valutarne la morte cellulare, che risulta essere direttamente proporzionale all'attività litica delle cellule effettrici. Ogni condizione è stata eseguita in triplicato e la percentuale di lisi specifica riportata è la media dell'intensità di fluorescenza dello ioduro di propidio dei singoli

campioni. Il livello massimo di morte cellulare è stato determinato incubando le cellule bersaglio con Triton X-100 0.5%.

L'attività citotossica è espressa come la percentuale di cellule morte tra le cellule bersaglio positive per il PKH-67: (numero di cellule morte PKH-67⁺/[numero di cellule morte PKH-67⁺ + numero di cellule vive PKH-67⁺]) x 100. Inoltre, la percentuale di mortalità delle cellule bersaglio è stata calcolata sottraendo la percentuale della morte spontanea rilevata nei campioni di controllo.

2.4.2. Quantificazione dei coniugati effettori-target

Le cellule NK resting e quelle attivate con IL-2 (0.7×10^6) sono state marcate, secondo quanto descritto da Callewaert et al. (1991), ma modificando le concentrazioni riportate per evitare problemi di compensazione al citofluorimetro, con il fluorocromo intracellulare calceina AM (1 ng/ml, per 1 h a 37°C). Allo stesso modo le cellule bersaglio della linea P815 sono state marcate con un secondo fluorocromo intracellulare, l'idroetidina (1 µg/ml). In alcuni esperimenti le cellule effettrici sono state incubate prima con l'inibitore D609 per 40 min a 37°C, e successivamente unite alle cellule bersaglio in rapporto 1:1. La sospensione cellulare è stata poi brevemente centrifugata a 200 rpm e incubata a 37°C per 15 min, infine è stata risospesa molto delicatamente con una pasteur di vetro. Le cellule sono

state poi mantenute a 4°C per 30 min, e successivamente analizzate al citofluorimetro a flusso. I coniugati sono stati valutati nel dot plot come eventi doppi positivi (verde e rosso) e il numero di complessi effettore-target stabili è stato calcolato su un numero fisso di cellule target acquisite (20000 eventi).

2.5. Microscopia confocale a scansione laser (CLSM)

Le cellule NK, trattate come descritto per le analisi di citofluorimetria a flusso, sono state lasciate sedimentare (15 min in ghiaccio) su vetrini precedentemente poli-lisinati (poly-L-lysine 0.01%, Sigma-Aldrich), dopo un lavaggio in PBS è stata effettuata l'incubazione con l'anticorpo specifico. In alcuni esperimenti, le cellule, prima della marcatura, sono state fissate con paraformaldeide (PFA) 3% (30 min, 4°C), permeabilizzate con Triton X-100 (0.5%, Sigma-Aldrich) (10 min a temperatura ambiente) e successivamente incubate con i relativi anticorpi.

I vetrini sono stati poi preparati per l'osservazione al CLSM utilizzando come *antifade* il Vectashield Mounting Medium con il colorante DAPI, per l'identificazione dei nuclei (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

I campioni sono stati analizzati mediante un microscopio confocale a scansione laser Leica TCS SP2 AOBS, dotato di laser a 405, 488, 543 e 633 nm, le linee spettrali di eccitazione sono state opportunamente regolate da un filtro "acousto-optical

tunable". L'acquisizione e l'elaborazione delle immagini sono state eseguite utilizzando i programmi Leica Confocal Software 2.3 (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany) e Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA). I segnali di emissione, provenienti dai differenti fluorocromi, sono stati acquisiti in parallelo e grazie al programma di analisi, è stato possibile sovrapporre i quattro segnali in modo da evidenziare zone di co-localizzazione (mostrate in giallo, magenta o verde acqua (pseudo-colori)). Numerose cellule sono state analizzate per ogni condizione di marcatura, nelle figure sono riportate le più rappresentative.

2.6. Saggio di attività enzimatica della PC-PLC

L'attività dell'enzima PC-PLC è stata misurata in vitro mediante il saggio funzionale Amplex Red[®] specifico per la fosfolipasi C (Molecular Probes) e discriminante per il contributo da parte della PC-pld, secondo le modifiche apportate da Spadaro et al. (2006). In breve, le cellule NK resting o attivate con IL-2 sono state incubate con l'anticorpo α -CD16 (B73.1, 30 min, a 4°C), seguito dal G α M, e successivamente coltivate a 37°C per diversi tempi (5, 10 e 30 min). L'inibitore D609 (50 μ g/ml) è stato aggiunto alla coltura cellulare per 40 min, prima dell'incubazione con gli anticorpi per gli esperimenti eseguiti sulle cellule NK, al contrario, negli esperimenti su cellule di carcinoma ovarico, in cui l'inibitore è stato direttamente

aggiunto alla coltura. Entrambi i tipi cellulari sono stati poi lisati in ghiaccio nel buffer RIPA, costituito da 150 mM NaCl, 100 mM TRIS-HCl pH 8, 1% Triton X-100, 1 mM MgCl₂ e dagli inibitori delle proteasi (Roche), centrifugati per 10 min a 20000xg per rimuovere le componenti insolubili al detergente. La determinazione proteica è stata effettuata utilizzando il saggio Bradford (Bio-Rad Laboratories, GmbH, München). L'attività enzimatica della PC-PLC è stata misurata utilizzando una prima miscela di reazione composta dal lisato cellulare risospeso in 50 mM TRIS-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM dimetilglutarato, 2mM CaCl₂ in presenza o meno della fosfatidilcolina e della fosfatasi alcalina, per poter discriminare tra il contributo dell'attività enzimatica della PLC e della PLD e per valutare i livelli basali di colina e fosfocolina. La reazione è stata bloccata dopo 10 e 20 min a 37°C mediante bollitura dei campioni. La risultante miscela di reazione è stata poi trasferita in una piastra a 96 pozzetti, in cui sono stati aggiunti il reagente Amplex Red, la colina ossidasi e la perossidasi di rafano (HRP). Dopo aver incubato questa miscela di reazione per 30 min al buio, è stata misurata la produzione di un composto fluorescente, resorufina, che risulta essere direttamente proporzionale all'attività enzimatica della PC-PLC, mediante uno spettrofluorimetro Perkin-Elmer LS-50B (eccitazione a 560 ± 5 nm, emissione a 590 ± 10 nm). La concentrazione relativa di colina, prodotta durante il saggio enzimatico, è stata calcolata con una curva standard di colina in acqua (da 2 a 0.062 nmoli).

2.7. Preparazione di microdomini di membrana

I microdomini Triton-insolubili (LTDI) sono stati isolati secondo la procedura descritta da Parolini et al. (1996). Brevemente, 1×10^9 cellule NK attivate con IL-2 sono state lisate in 1 ml di MBS (25 mM MES, pH 6.5, 150 mM NaCl) oppure incubate con l'inibitore D609 (50 $\mu\text{g/ml}$) per 40 min prima della lisi. Successivamente, entrambe le preparazioni sono state omogeneizzate nel buffer MBS a cui sono stati aggiunti 1% di Triton X-100 e gli inibitori delle proteasi. Questa miscela è stata unita ad una soluzione di saccarosio all'80% e trasferita sul fondo di un tubo da ultracentrifuga. Un gradiente di saccarosio dal 30% al 5% è stato poi aggiunto sopra il lisato e la sospensione è stata centrifugata a 45000 rpm per circa 16h a 4°C in un rotore SW60 (Beckman Instruments, Palo Alto, California, USA). I microdomini, sono stati poi raccolti, lavati due volte in MBS a 14000 rpm per 30 min a 4°C, e ne è stata determinata la concentrazione proteica mediante il saggio Bradford (Bio-Rad Laboratories).

2.8. Immunoprecipitazione, SDS-PAGE e Western blotting

Cellule NK attivate con IL-2 sono state lisate in 200 μl del buffer AKT (150 mM NaCl; 20 mM Tris pH 7.4; 1% Nonidet P-

40; 10% glicerolo; 1 mM Na₃VO₄; inibitori delle proteasi), per 20 min in ghiaccio. In seguito, i nuclei sono stati rimossi mediante centrifugazione a 12000 rpm per 15 min at 4°C. La determinazione proteica è stata effettuata utilizzando il saggio Bradford (Bio-Rad Laboratories) e circa 500 µg di lisato totale, in un volume finale di 500 µl, sono stati incubati con il 10% della proteina G sefarosio (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) e con l'anticorpo anti-PC-PLC oppure con l'anticorpo anti-CD16 (B73.1) per circa 16 h a 4°C sotto rotazione. Gli immunoprecipitati sono stati poi lavati con 150 µl di IP buffer (50 mM HEPES pH 6.9; 10 mM EDTA; 1% Triton X-100; 300 mM NaCl; inibitori delle proteasi). La resina è stata successivamente rimossa in tre passaggi: centrifugazione a 14000 rpm per 1 min a 4°C, aggiunta del SDS-sample buffer 4x, contenente 2-β-mercaptoetanololo, e bollitura del campione per 5 min.

Gli immunoprecipitati, e 10 µg di proteine da ogni frazione del gradiente di saccarosio (1-12) sono state risolte mediante SDS-PAGE (al 7% di acrilammide) in condizioni riducenti e trasferite su un filtro di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Germany). Successivamente, i filtri sono stati incubati in una soluzione di TBST (Tris 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%) contenente il 5% p/v di "milk" non grasso per 1 h a temperatura ambiente, seguita dall'incubazione in TBST per 1 h a temperatura ambiente con gli anticorpi, indicati nei vari esperimenti, alle opportune diluizioni. Dopo alcuni lavaggi in TBST, ogni filtro è stato incubato con

l'appropriato anticorpo secondario coniugato HRP. Infine, i filtri sono stati incubati con il Super Signal West Pico (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA) secondo le istruzioni riportate dal produttore. Le proteine sono state successivamente rilevate mediante autoradiografia su lastre fotografiche CL-Xposure Film (Pierce).

2.9. Saggio di attività della sfingomielin sintasi (SMS)

L'attività della SMS è stata misurata secondo il metodo utilizzato da Meng et al. (2004). Le cellule NK attivate con IL-2 sono state trattate come descritto per il saggio di attività enzimatica della PC-PLC, e omogeneizzate in una siringa con ago da 27G in un buffer di lisi costituito da 250 mM di saccarosio; 5 mM di HEPES, pH 7.4 e da inibitori delle proteasi. I nuclei sono stati rimossi mediante centrifugazione a 100xg per 10 min a 4°C e la determinazione proteica è stata effettuata con il saggio Bradford (Bio-Rad Laboratories). In seguito, 250 µg di proteine totali sono state incubate per 10' a 37°C nel buffer di reazione composto da 50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 25 mM KCl e 0,5 mM EDTA. La reazione enzimatica è iniziata con l'aggiunta, e la successiva incubazione per 30 min, di 10 nmol di ceramide coniugato con Bodipy-TR (BTR) e 60 nmol di fosfatidilcolina (Molecular Probes). La stessa reazione è stata poi bloccata dall'ulteriore aggiunta di 1 ml di cloroformio/metanolo (1:1,

v/v). I lipidi sono stati estratti e risolti mediante cromatografia su strato sottile (TLC) in una miscela di cloroformio/metanolo/acido acetico glaciale/H₂O (50:37.5:3.5:2). La formazione di sfingomieline coniugate con BTR è stata quantificata utilizzando un phosphoimager che ne ha misurato l'intensità di fluorescenza (Typhoon 9200, Amersham Biosciences, UK).

3. RISULTATI

3.1. Endocitosi anticorpo-mediata del recettore CD16 espresso sulla membrana delle cellule NK

La presenza del recettore sulla membrana plasmatica è stata analizzata, mediante citofluorimetria a flusso, su cellule NK resting non fissate, incubate con l'anticorpo anti-CD16-FITC. Quando le cellule vengono mantenute a 4°C per i tempi indicati in Figura 7A (▲) si può osservare come l'espressione del CD16 (valutata in termini di intensità media di fluorescenza MFI) permane pressoché costante. Al contrario, quando le cellule NK, dopo esser state marcate con l'anticorpo, vengono mantenute in coltura a 37°C (in presenza del 5% di CO₂) per i tempi indicati, mostrano una riduzione di circa il 50% della MFI entro 20 minuti, che si protrae nel tempo (Fig.7A, ■).

La scomparsa del recettore CD16 dalla membrana plasmatica ha portato ad ipotizzare due possibili meccanismi responsabili di questo fenomeno: endocitosi o shedding.

Allo scopo di evidenziare il meccanismo sono stati eseguiti esperimenti di doppia marcatura esterna in microscopia confocale a scansione laser (CLSM). Le cellule NK non fissate sono state prima incubate con l'anticorpo anti-CD16 B73.1, (Figura 7B, verde), in modo da ingaggiare le molecole di recettore presenti sulla membrana plasmatica, sono state poi poste in coltura a 37°C per 10 e 30 min e nuovamente marcate in

membrana con un secondo anticorpo anti-CD16 (3G8, Fig. 7B, rosso). Come illustrato nella figura, al tempo 0 si ha una perfetta co-localizzazione tra i due anticorpi, mentre già dopo 10 minuti di coltura a 37°C (Fig. 7B, b) si possono osservare due distinte distribuzioni del recettore: le molecole ingaggiate al tempo 0 appaiono via via all'interno del citoplasma e sembrano essere associate a strutture vescicolari ben distinte; mentre nuove molecole di CD16 vengono prontamente ri-esprese sulla superficie cellulare.

Per meglio comprendere l'origine di queste nuove molecole di recettore ri-esprese sulla membrana plasmatica delle cellule NK, sono stati condotti esperimenti utilizzando un inibitore della sintesi proteica, la cicloesimide (CHX). In particolare, il CD16 è stato ingaggiato al tempo 0 con l'anti-CD16-FITC, le cellule sono state messe in coltura a 37°C in presenza dell'inibitore (50 µg/ml) per i tempi riportati in Figura 7C, e successivamente marcate in membrana con l'anticorpo anti-CD16-PE, prima di essere analizzate. Come si può osservare dai dati di citofluorimetria a flusso, si ha una drastica diminuzione nel tempo, fino ad una totale scomparsa dell'espressione del recettore CD16 dalla membrana plasmatica delle cellule NK trattate con la CHX (Fig. 7C, ○). Colture di controllo mostrano, invece, un'espressione del recettore più o meno costante nel tempo (◆).

Parallelamente, le osservazioni al microscopio confocale di cellule NK incubate a 37°C in presenza di CHX mostrano una completa scomparsa dalla membrana plasmatica del CD16 dopo

30 min di trattamento (mostrato in rosso nella Figura 7 B, d); mentre il recettore ingaggiato al tempo 0 (in verde) subisce solo un piccolo tasso di endocitosi. Le colture di controllo, al contrario, presentano livelli costanti di espressione in membrana del CD16 (Fig. 7 B, c).

Da questi risultati si evince che il CD16 viene endocitato, degradato e neosintetizzato, poiché l'inibizione della sintesi proteica, operata dalla CHX, impedisce la sua ri-espressione in membrana. Si può pertanto escludere che vada incontro al meccanismo di recycling, infatti, se così fosse sarebbe sempre presente in membrana anche dopo il blocco della sintesi proteica.

Per esaminare in maniera più approfondita l'internalizzazione del CD16 e valutare la sua dipendenza o indipendenza dall'apporto di ATP come fonte di energia, le cellule NK sono state trattate con sodio azide (NaN_3 , per 30' in ghiaccio) un composto che blocca la produzione di questa fonte energetica. Dopo il trattamento le cellule sono state incubate a 37°C per i tempi indicati in Figura 7 D e successivamente è stata fatta l'analisi sia in citofluorimetria a flusso (Figura 7 D) che in CLSM (Figura 7 E). Nonostante la deplezione dell'ATP, il recettore CD16 ingaggiato viene comunque internalizzato (Figura 7 D, ●), con una cinetica più veloce rispetto a quella riscontrata nelle colture di controllo (■). Allo stesso tempo, le osservazioni al microscopio confocale (Figura 7 E) mettono in evidenza una scomparsa dell'antigene (mostrato in verde) dalla membrana plasmatica, più o meno con la stessa modalità

riscontrata nel controllo (Figura 7 H), fenomeno più chiaro se si considera la posizione del citoscheletro actinico corticale, rilevato mediante colorazione con falloidina (in rosso). I dati ottenuti suggeriscono che l'endocitosi del CD16 non sia un fenomeno ATP-dipendente, poiché la sottrazione di energia, mediante somministrazione di NaN_3 , non influisce sull'internalizzazione del recettore.

Il citoscheletro actinico corticale gioca un ruolo fondamentale nel meccanismo endocitotico, infatti, localizza il macchinario necessario per la formazione delle vescicole, aiuta la membrana nel suo movimento di invaginazione, e guida le stesse vescicole all'interno del citoplasma.

Allo scopo di comprendere la funzione del citoscheletro corticale nell'endocitosi del CD16, è stato utilizzato un farmaco diretto contro i filamenti actinici, la Jasplakinolide. Questa aumenta la polimerizzazione dell'actina, legandosi all'actina-G globulare e promuovendone il legame all'actina-F. Questo effetto rende il citoscheletro corticale non più disponibile alla falloidina.

Le cellule Natural Killer, quindi, sono state preincubate con la Jasplakinolide $10\mu\text{M}$ (concentrazione ottimale per rendere il citoscheletro actinico iperpolimerizzato) per 30' in ghiaccio e successivamente portate a 37°C per diversi tempi. L'analisi al citofluorimetro a flusso ha evidenziato un'espressione in membrana del CD16 che si mantiene più o meno costante nel tempo (Fig. 7 F, ●), mentre nelle cellule di controllo si ha il tipico andamento decrescente (Figura 1 F, ■).

Parallelamente gli studi effettuati con il CLSM hanno confermato i dati ottenuti in citofluorimetria. In particolare, nella Figura 7 G si può osservare come l'azione della Jasplakinolide che lega competitivamente la falloidina, blocchi il recettore CD16, ingaggiato dal suo anticorpo, nella regione corticale. Risultati simili sono stati ottenuti utilizzando un altro farmaco, la Latrunculina A (Lat A), che blocca la formazione dei filamenti di F-actina, legandosi irreversibilmente ai monomeri globulari di actina-G e causando una marcata depolimerizzazione del citoscheletro actinico corticale (dati non mostrati). Questi dati, collettivamente, indicano che l'endocitosi del recettore di membrana CD16 è bloccata sia a seguito della depolimerizzazione che dell'aumentata polimerizzazione del citoscheletro actinico corticale, sottolineando, ancora una volta, l'importanza di un citoscheletro intatto e funzionale per far avvenire l'internalizzazione dell'antigene.

Riepilogando, il recettore CD16 sulle cellule NK viene internalizzato a seguito dell'ingaggio con il suo anticorpo specifico. Inoltre, è stato dimostrato che questo processo di endocitosi si conclude con la degradazione e la nuova sintesi del recettore CD16, che non sembra essere dipendente dall'ATP e che, invece, richiede un citoscheletro actinico intatto e funzionale.

3. 2. Specificità dell'anticorpo anti-PC-PLC

Gli esperimenti di questo lavoro di tesi sono stati condotti utilizzando un anticorpo policlonale anti-PC-PLC di coniglio prodotto nel nostro laboratorio (Podo et al., 1996). Al fine di provare la specificità di questo reagente sono stati effettuati, in precedenza, esperimenti di Western Blotting in cui si era dimostrato che l'anticorpo è in grado di riconoscere un'isoforma dell'enzima PC-PLC con il peso molecolare di circa 66 kDa in fibroblasti murini NIH 3T3.

Per valutare se effettivamente la proteina riconosciuta dall'anticorpo avesse attività fosfolipasica, è stato utilizzato il metodo dell'*Amplex Red* specifico per misurare l'attività della PC-PLC (Ramoni et al. 2004, Spadaro et al., 2006). Come mostrato nello schema della Figura 8 A il kit riproduce le condizioni ideali per l'enzima PC-PLC (concentrazione di sali, pH, ecc.), ed è costituito da una miscela enzimatica che reagendo con gli opportuni substrati porta alla formazione di betaina e H_2O_2 . L'*Amplex Red* reagisce con H_2O_2 in rapporto 1:1, ed in presenza di perossidasi di rafano (*horseradish peroxidase*, HRP) viene convertito in un composto fluorescente, la resorufina. Quest'ultima ha una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 560 nm e quella di emissione a 590 nm (misurate con lo spettrofluorimetro Perkin Elmer LS50B).

Gli esperimenti sono stati condotti con lisati cellulari NIH 3T3 che mostrano una percentuale di rilascio della resorufina piuttosto alta (normalizzata al 100% nel controllo). Quando dal

tampone di reazione viene sottratto l'enzima fosfatasi alcalina (PA), che catalizza la produzione di colina (Cho) a partire da fosfocolina (PCho), i valori di fluorescenza della resorufina, dovuti all'azione enzimatica della sola fosfolipasi d (PC-pld), diventano estremamente bassi. Ciò indica che l'elevata percentuale di fluorescenza misurata nel controllo è prodotta in massima parte dall'attività della PC-PLC. Inoltre, se non viene aggiunto il substrato di partenza (PC) su cui agiscono gli enzimi del kit (Figura 8, B) non è possibile misurare alcuna fluorescenza emessa dalla resorufina. In questa condizione, infatti, vengono considerate soltanto la PCho e la Cho endogene, presenti in concentrazioni molto basse.

Per provare che il nostro anticorpo policlonale anti-PC-PLC riconosce specificamente l'enzima, biglie immunomagnetiche (Tosyl-activated) sono state incubate con l'anticorpo e successivamente con i lisati cellulari 3T3 in rapporti differenti (come mostrato in figura 8, B). Dopo 2 ore di incubazione la proteina riconosciuta dall'anticorpo è stata allontanata, mediante separazione magnetica, ed è stata valutata l'attività della PC-PLC residua nei lisati stessi. Come si può osservare dalla figura la deplezione dell'enzima dai lisati risulta in una diminuzione della percentuale di resorufina misurata.

Nel pannello C della Figura 8 è rappresentato un altro esperimento effettuato utilizzando il kit dell'*Amplex Red*. I lisati cellulari NIH 3T3 sono stati incubati con l'anticorpo policlonale anti-PC-PLC per 2 ore (a destra) e poi utilizzati per le reazioni enzimatiche (con questa procedura l'enzima PC-PLC è ancora

presente nei lisati, a differenza dell'esperimento precedente). La percentuale di fluorescenza della resorufina prodotta ha mostrato una diminuzione di circa l'80% rispetto al controllo (normalizzato).

Questi risultati, collettivamente, indicano che l'anticorpo policlonale anti-PC-PLC, prodotto nel nostro laboratorio, riconosce una proteina con attività enzimatica PC-PLC e che, presumibilmente, tra i molteplici epitopi riconosciuti vi è il sito catalitico dell'enzima stesso, poiché a seguito del legame con l'anticorpo l'attività enzimatica subisce una drastica diminuzione.

3.3. Ruolo dell'enzima PC-PLC nella regolazione dell'espressione in membrana del recettore CD16

Recentemente, ulteriori studi condotti nel nostro laboratorio hanno evidenziato una correlazione diretta tra l'espressione in membrana dell'enzima PC-PLC e quella del recettore CD16, suggerendo così un ruolo funzionale dell'enzima nella maturazione e nell'acquisizione del fenotipo litico da parte delle cellule NK (Spadaro et al., 2006).

Si è voluto verificare l'effetto dell'inibitore della PC-PLC, D609, sull'espressione di questi due antigeni di membrana specifici delle cellule NK.

A tal fine sono stati condotti esperimenti di citofluorimetria a flusso, utilizzando cellule NK *resting* e cellule NK attivate con

rIL-2 umana, entrambe non fissate. Il D609 (50 μ g/ml) è stato aggiunto, alle cellule in coltura, 15 minuti prima dell'incubazione con gli anticorpi relativi. L'espressione in membrana dei due antigeni risulta essere molto elevata nelle cellule di controllo (NK resting: PC-PLC 80 \pm 8% e CD16 93 \pm 7%; NK attivate: PC-PLC 89 \pm 6% e CD16 97 \pm 3%).

Quando le cellule NK vengono preincubate con lo xantato D609, si ha una diminuzione dell'espressione dell'enzima PC-PLC pari al 30 \pm 8% nelle cellule NK resting (Figura 9, A) e al 85 \pm 6% nelle cellule NK attivate con IL-2 (Fig. 9, C). Sorprendentemente, le analisi al FACS hanno mostrato una down-modulazione dalla membrana plasmatica anche del recettore CD16, con una diminuzione del 45 \pm 7% nelle cellule NK resting e del 47 \pm 3% nelle cellule attivate con IL-2 (Fig. 9 B, D).

Le osservazioni al CLSM eseguite su cellule NK purificate e non fissate, pre-incubate con l'inibitore D609 prima di effettuare la marcatura con gli anticorpi relativi, evidenziano una scomparsa, pressoché totale, dalla superficie cellulare sia dell'enzima PC-PLC che del CD16 (Fig. 9 E, pannello inferiore), mentre nelle cellule di controllo si ha una co-localizzazione parziale di entrambe le molecole a livello della membrana plasmatica (Fig. 9 E, pannello superiore). Da questi risultati si deduce che, in qualche modo, l'attività dell'enzima PC-PLC modula la presenza del recettore CD16 in membrana, poiché l'inibitore specifico della PC-PLC, oltre a down-regolare,

l'espressione dell'enzima stesso, provoca una marcata riduzione del CD16.

3.4. Localizzazione dell'enzima PC-PLC e del recettore CD16 nei microdomini di membrana delle cellule NK

Al fine di caratterizzare in dettaglio la relazione spaziale tra l'enzima PC-PLC e il recettore CD16 sulla membrana plasmatica delle cellule NK, sono stati condotti esperimenti di frazionamento cellulare mediante gradiente di saccarosio. Le analisi di Western blot mostrano che il recettore CD16 è presente sia nei microdomini di membrana Triton-insolubili, o *rafts*, (Figura 9 F, lanes 3-5) che nelle frazioni solubili (lanes 7-11). Quando l'enzima PC-PLC viene inibito dal D609, (50 µg/ml, 40 min) il CD16 scompare dai *rafts*, mentre la sua distribuzione rimane inalterata nelle frazioni solubili.

Inoltre, anche l'enzima PC-PLC è stato rilevato nei microdomini di membrana (lanes 4-6), sebbene la quantità sembra essere inferiore a quella riscontrata nelle frazioni Triton-solubili (lanes 8-11). A seguito dell'incubazione con il D609, l'enzima PC-PLC scompare totalmente dai *rafts* e diminuisce fortemente nelle frazioni solubili.

Sono stati effettuati anche esperimenti di co-immunoprecipitazione, al fine di analizzare l'interazione tra il

recettore CD16 e l'enzima PC-PLC. Come mostrato nella Figura 9 G, gli immunoprecipitati con l'anticorpo anti-PC-PLC mostrano un'evidente associazione con il recettore CD16; mentre gli immunoprecipitati con l'anticorpo anti-CD16 mostrano un'associazione più debole con l'enzima PC-PLC, probabilmente dovuta ad una minore efficienza di immunoprecipitazione dell'anti-CD16 (Fig. 9 H).

3.5. Effetto specifico del D609 sulla down-modulazione dalla membrana plasmatica del recettore CD16

Allo scopo di analizzare più in dettaglio se l'effetto indotto dall'inibizione dell'enzima PC-PLC sull'espressione del recettore CD16 fosse il risultato di un'azione generica o specifica del D609, sono stati analizzati, dopo trattamento con D609 (50 µg/ml, 15 min), differenti markers fenotipici, mediante citofluorimetria a flusso. Nella Figura 10 sono indicate le varie sottopopolazioni di PBL umani esaminate: PBL resting (pannello A), cellule NK resting purificate (pannello B) e PBL attivati con IL-2 (pannello C). I marker caratteristici dei linfociti T, come CD3, CD4 e CD8 non cambiano significativamente la loro espressione in membrana a seguito dell'incubazione con il D609. Simili risultati sono stati ottenuti per i marcatori di attivazione, tra cui CD25, CD69, HLA-DR, CD71 (non mostrati

in figura). Tra i markers fenotipici espressi dalle cellule NK, sia resting che attivate con IL-2, CD16, CD56, CD337 (NKp30), CD336 (NKp44) e CD335 (NKp46), soltanto il CD16 risulta essere fortemente down-modulato dal D609 (Fig. 10, pannelli A-C). Collettivamente, questi dati indicano che l'inibizione dell'enzima PC-PLC ha un effetto altamente specifico sull'espressione in membrana del recettore CD16, suggerendo quindi che la PC-PLC potrebbe svolgere un ruolo regolatorio sul mantenimento in superficie di questo antigene essenziale per le cellule NK.

3.6. Ruolo funzionale dell'enzima PC-PLC nei meccanismi litici CD16-mediati

Per valutare se la regolazione del recettore CD16 da parte dell'enzima PC-PLC avesse implicazioni funzionali, sono stati eseguiti, mediante citofluorimetria a flusso, saggi di citotossicità anticorpo-mediata (redirect killing assay) contro cellule bersaglio della linea di mastocitoma murino P815 FcR⁺. Queste ultime, sono state marcate in membrana con il colorante PKH-67 prima della co-coltura con le cellule effettrici, condotta a 37°C per 90 min. Successivamente, alla sospensione cellulare è stata aggiunta una soluzione contenente 2 µg/ml di ioduro di propidio. L'analisi al FACS è stata eseguita sulle cellule bersaglio positive per il colorante PKH-67 e per lo ioduro di

propidio, misurando l'incorporazione di quest'ultimo come direttamente proporzionale alla lisi cellulare. Come atteso, l'attività citolitica misurata nelle cellule NK resting e nelle cellule NK attivate con IL-2 aumenta fortemente quando queste vengono pre-incubate con l'anticorpo anti-CD16 (Figura 11, ■), se confrontata con la citotossicità naturale (Fig. 11, ●). In particolare, quando le cellule NK resting vengono utilizzate come effettori in un rapporto E:T 100:1 con le cellule bersaglio, l'attività litica mediata dall'anticorpo anti-CD16 raggiunge il 30%, mentre la citotossicità naturale è pari al 15% (Fig. 11, A). Quando le cellule NK attivate con IL-2 vengono utilizzate nel rapporto E:T 2:1, circa il 77% delle cellule bersaglio va incontro a lisi specifica, mentre la citotossicità in assenza dell'anticorpo è pari al 34% (Fig. 11, B, ●).

Sorprendentemente, quando le cellule effettrici vengono incubate con l'inibitore dell'enzima PC-PLC, D609, per 40 min prima di effettuare il test di citotossicità, la loro attività litica anti-CD16-mediata viene drasticamente ridotta, sia nelle cellule NK resting (Fig. 11, A, ▲) che nelle cellule NK attivate con IL-2 (Fig. 11, B, ▲), rispettivamente a valori prossimi al 6% e al 13%. L'incubazione delle sole cellule bersaglio P815 con il D609, non ha alcun effetto sull'attività litica delle cellule NK resting né di quelle attivate con IL-2 (dati non mostrati). Nella Figura 11 sono anche riportati i valori di citotossicità misurati dopo l'incubazione delle cellule effettrici con anticorpi non correlati (anti-CD4, ○) e con frammenti F(ab')₂ dell'anti-CD16 (□). Per valutare se l'inibizione dell'enzima PC-PLC avesse

implicazioni funzionali anche su altri meccanismi citolitici mediati da altri recettori attivatori delle cellule NK, come il recettore NKp46, sono stati eseguiti gli stessi esperimenti stimolando le cellule NK attivate con IL-2 attraverso NKp46 (Fig. 11, C). Quando le cellule effettrici vengono ingaggiate con l'anticorpo anti-NKp46, l'attività citolitica aumenta fino al 12% (nel rapporto E:T 2:1, ◆) rispetto alla citotossicità naturale (●), ma non raggiunge mai gli elevati livelli riscontrati nella citotossicità CD16-mediata (Fig. 11, C, ■). Inoltre, l'incubazione delle cellule effettrici con l'inibitore D609 non modifica significativamente l'attività litica delle cellule NK attivate con IL-2 e stimulate nel pathway del recettore NKp46 (Fig. 11, C, ◇). Questi risultati indicano, collettivamente, che l'enzima PC-PLC è coinvolto nei meccanismi litici CD16-mediati, mentre non sembrerebbe svolgere alcun ruolo funzionale sulla citotossicità mediata da altri recettori attivatori, come NKp46.

3.7. L'inibizione dell'enzima PC-PLC non ha effetto sulla formazione dei coniugati tra cellule NK e cellule bersaglio

Successivamente, sono stati condotti esperimenti di citofluorimetria a flusso per determinare se l'inibizione dell'enzima PC-PLC ad opera del D609 fosse critica non soltanto per il mantenimento del recettore CD16 sulla membrana

plasmatica delle cellule NK, ma anche per la formazione dei coniugati tra cellule effettrici e cellule bersaglio. Le cellule NK sono state incubate prima con il colorante calceina AM (1 ng/ml, per 1 h a 37°C) e, in seguito, con il D609 (50 µg/ml per 40 min), mentre le cellule bersaglio della linea P815 sono state incubate con il fluorocromo intracellulare idroetidina (1 µg/ml). L'analisi al FACS è stata condotta acquisendo un numero fisso di eventi doppio positivi (20000). L'esposizione al D609 non ha alcun effetto sulla formazione dei coniugati tra le cellule NK e le cellule P815. Infatti, la percentuale di coniugati, misurata in sei esperimenti indipendenti, è risultata simile sia nel controllo ($54 \pm 4\%$) che nelle cellule trattate con l'inibitore ($49 \pm 7\%$).

3.8. Attività enzimatica della PC-PLC e della sfingomielin sintasi (SMS) dopo stimolazione del recettore CD16

Al fine di studiare più in dettaglio il ruolo funzionale svolto dall'enzima PC-PLC a seguito dell'ingaggio del recettore CD16 con il suo anticorpo specifico, sono stati condotti saggi di attività enzimatica con il metodo Amplex Red. Il recettore CD16 è stato stimolato con l'anticorpo B73.1, seguito dal suo specifico anticorpo secondario, in modo da ingaggiare il recettore con uno stimolo più potente, e sono state messe in coltura a 37°C per i tempi indicati in Figura 12.

L'attività dell'enzima PC-PLC aumenta di circa due volte (2.4 ± 0.4) entro 10 min dallo stimolo, nelle cellule NK resting purificate (Fig. 12, A), rispetto ai valori misurati a 10 min nelle cellule di controllo (0.040 ± 0.004 pM colina/min/ μ g proteina).

Al contrario, nelle cellule NK attivate con IL-2 l'attività enzimatica della PC-PLC aumenta da due a quattro volte (a seconda del donatore) entro 5 min dalla stimolazione del recettore CD16, rispetto ai valori misurati nelle cellule di controllo non stimulate (0.097 ± 0.005 pM colina/min/ μ g proteina; Fig. 12, B). Successivamente, l'attività della PC-PLC diminuisce entro 30 min fino a tornare ai valori misurati nel controllo non stimolato, sia nelle cellule NK resting che nelle cellule NK attivate con IL-2.

Quando le cellule NK vengono pre-incubate con l'inibitore D609, l'attività enzimatica della PC-PLC mostra una drastica riduzione a valori più bassi rispetto a quelli misurati nei controlli non CD16-stimolati. Inoltre, l'attività della PC-pld, misurata come specificato nella sezione Materiale e Metodi, non subisce variazioni significative dopo trattamento con il D609, mentre viene stimolata a seguito dell'ingaggio del recettore (Figura 13 A, B).

Studi condotti su altri sistemi cellulari hanno evidenziato che gli effetti biologici più rilevanti, assegnati all'attività dell'enzima PC-PLC, possono essere esercitati da un altro enzima, anch'esso coinvolto nell'idrolisi della PC e presumibilmente soggetto all'azione inibitrice del D609, la sfingomielin sintasi (SMS).

Questo enzima media il trasferimento della Pcho ai ceramidi, per formare sfingomieline (Luberto e Hannun 1998).

Allo scopo di chiarire se anche la SMS potesse essere up-regolata dall'ingaggio del recettore CD16, ne è stata misurata l'attività mediante cromatografia su strato sottile (TLC), valutando la formazione di sfingomieline coniugate con BTR (Bodipy-TR).

Le cellule NK attivate con IL-2 sono state stimolate con la stessa procedura e per gli stessi tempi considerati negli esperimenti di misurazione dell'attività dell'enzima PC-PLC.

Come mostrato nella Figura 12, C (a sinistra), l'attività della SMS non subisce variazioni significative a nessun tempo dopo la stimolazione del recettore CD16. Inoltre, l'incubazione dell'inibitore dell'enzima PC-PLC, D609, non altera l'attività della SMS, per nessuno dei tempi considerati (Fig. 12 C, a destra).

Infine, le analisi quantitative eseguite sul prodotto finale della reazione enzimatica, la sfingomieline coniugata con BTR, hanno mostrato sia nelle cellule stimolate con l'anti-CD16, sia in quelle pre-incubate con il D609, valori simili a quelli misurati nelle cellule di controllo (Tabella 1).

In conclusione, i dati ottenuti sull'attività enzimatica della PC-PLC suggeriscono che questa possa essere implicata nei primi eventi che si verificano subito dopo l'ingaggio del recettore CD16, poiché l'attività dell'enzima subisce un incremento, da due a quattro volte, a seguito della stimolazione del CD16 con il suo relativo anticorpo. Inoltre, nel nostro sistema cellulare e

nelle nostre condizioni, abbiamo dimostrato che l'inibitore della PC-PLC, D609, non è in grado di inibire anche l'attività dell'altro enzima coinvolto nell'idrolisi della PC, la SMS.

4. DISCUSSIONE

Lo scopo di questa tesi sperimentale è stato quello di ampliare le conoscenze sulla biologia delle cellule Natural Killer umane, sottopopolazione linfocitaria del sangue periferico. Queste cellule rappresentano l'anello di congiunzione tra l'immunità innata e quella specifica e sono, da tempo, oggetto di studio da parte del nostro gruppo.

L'attivazione delle cellule NK da parte di ligandi solubili specifici o di cellule sottoposte a trasformazione neoplastica o ad infezione virale o batterica, porta all'innesco di una serie di eventi biochimici il cui risultato finale è la lisi della cellula bersaglio sensibile. Tra le varie molecole coinvolte nella regolazione del macchinario citolitico le fosfolipasi sembrano giocare un ruolo fondamentale. In particolare, la nostra attenzione è rivolta all'enzima PC-PLC, specifico per il ciclo della fosfatidilcolina, la cui espressione in membrana sembra essere una caratteristica peculiare delle cellule NK (Spadaro et al., 2006). Precedenti studi (Ramoni et al., 2001) hanno evidenziato la presenza dell'enzima all'interno dei granuli litici e la sua traslocazione dalla zona di produzione (reticolo endoplasmatico) alla zona di contatto tra la cellula effettrice e la cellula bersaglio. Inoltre, è stata evidenziata una correlazione diretta tra i livelli di espressione sulla membrana plasmatica dell'enzima PC-PLC e del recettore CD16, suggerendo che la PC-PLC possa svolgere un ruolo importante anche nella

maturazione delle cellule NK, poiché l'aumento dell'espressione del recettore solitamente si accompagna all'acquisizione della capacità litica (Spadaro et al., 2006).

Sulla base di queste osservazioni lo scopo di questa tesi è stato quello di investigare più in dettaglio la relazione esistente tra l'enzima PC-PLC e il recettore CD16, e il traffico recettoriale a cui il CD16 va incontro a seguito della sua stimolazione con un anticorpo specifico.

A questo riguardo, Mota et al. (2004) hanno dimostrato che come conseguenza del *cross-linking* del recettore CD16, da parte di un anticorpo monoclonale specifico, l'espressione di questo antigene sulla membrana plasmatica delle cellule NK viene modulata. Il CD16 va incontro ad un processo di internalizzazione e di degradazione enzimatica e stimola, a sua volta, l'attività della protein tirosin-chinasi (PTK) ed induce la fosforilazione della subunità ζ ad esso associata (Mota et al., 2004; Viver et al., 1991).

Gli esperimenti condotti mediante citofluorimetria a flusso e microscopia confocale a scansione laser, hanno dimostrato che il recettore CD16, dopo essere stato ingaggiato dal suo anticorpo specifico, viene velocemente internalizzato (entro 10 minuti) e non più riespresso sulla membrana plasmatica delle cellule NK, condividendo un meccanismo simile a quello descritto nei linfociti T, in cui il complesso recettoriale TCR-CD3 internalizza a seguito di ingaggio con l'anticorpo specifico e viene degradato nei lisosomi, dopo essere stato ubiquitinato (Valitutti et al., 1997).

Inoltre, è stato visto come nuove molecole di recettore vengano

prontamente espresse sulla superficie cellulare delle NK, indicando che il mantenimento di livelli basali di espressione del CD16 è un meccanismo essenziale per l'attività immune delle cellule NK. Allo stesso tempo, non appena le molecole di CD16 vengono internalizzate, una loro rapida degradazione potrebbe essere importante per inattivare quei recettori già stimolati, mentre nuove molecole vengono riespresse sulla membrana cellulare e sono pronte ad interagire con i ligandi.

Il citoscheletro actinico svolge un ruolo fondamentale nei diversi meccanismi di endocitosi (Qualmann & Kessels, 2002), ed è stato dimostrato il suo ruolo anche nell'internalizzazione del recettore CD16. Gli esperimenti condotti usando due reagenti specifici, Jasplakinolide e Latrunculina A, che rispettivamente stabilizzano o disgregano i filamenti di actina, suggeriscono che l'endocitosi del CD16 è fortemente dipendente da un citoscheletro actinico integro e funzionale, poiché le alterazioni della sua polimerizzazione inducono un blocco delle molecole di recettore sulla membrana plasmatica delle cellule NK.

Inoltre, è stato visto come la traslocazione del recettore CD16, ingaggiato dal suo anticorpo specifico, dalla membrana plasmatica ai compartimenti intracellulari, avvenga secondo un processo cellulare passivo, indipendente quindi dalla disponibilità di ATP come fonte di energia.

Alla luce delle osservazioni riportate da Spadaro et al. (2006), sulla corrispondenza reciproca tra l'espressione dell'enzima PC-PLC e quella del recettore CD16 sulla superficie cellulare delle cellule NK, è stata analizzata in dettaglio la distribuzione di

questi due antigeni a livello di strutture specifiche di membrana. I microdomini di membrana, o *rafts*, costituiscono regioni altamente specializzate della membrana plasmatica e rappresentano importanti domini strutturali che permettono il reclutamento dei complessi proteici deputati alla trasduzione del segnale (Simons & Toomre, 2000).

Il riarrangiamento dei *rafts* e la loro polarizzazione nella zona di contatto tra la cellula NK e la cellula bersaglio, consentono la concentrazione di specifiche proteine e l'esclusione di altre, al fine di modulare segnali positivi e negativi cruciali per il compimento delle funzioni citotossiche (Lou et al., 2000).

Mediante analisi di microscopia confocale era stata dimostrata una parziale associazione del recettore CD16 nei microdomini di membrana (Galandrini et al., 2002).

In accordo con queste osservazioni, i nostri risultati indicano chiaramente la presenza del CD16 in queste strutture specializzate della membrana plasmatica nelle cellule NK attivate con IL-2. Per la prima volta, anche l'enzima PC-PLC è stato rilevato all'interno dei *rafts*, e esperimenti di co-immunoprecipitazione hanno dimostrato l'esistenza di un'associazione covalente tra i due antigeni. Inoltre, è stato visto come l'inibizione della PC-PLC, ad opera del D609, induca una scomparsa pressoché totale sia del CD16 che dell'enzima da questi domini strutturali di membrana, suggerendo, quindi, che lo stato attivo della PC-PLC possa essere essenziale per il mantenimento in membrana di recettori importanti per le funzioni immuni delle cellule NK, come il CD16.

Il composto D609, uno xantato, è ben conosciuto come un inibitore della PC-PLC ed è ampiamente utilizzato per investigare il ruolo di questo enzima in numerosi processi cellulari, tra cui l'attivazione dei macrofagi in risposta al LPS e l'attivazione dei linfociti B mediata dal recettore CD38 (Cuschieri et al., 2006; Moreno-García et al., 2005).

Al fine di analizzare più in dettaglio la relazione tra il CD16 e l'enzima PC-PLC, è stata misurata la sua attività enzimatica a seguito di stimolazione del recettore con il suo anticorpo specifico. I risultati ottenuti indicano che la PC-PLC potrebbe essere coinvolta nei primi *steps* della cascata di trasduzione del segnale innescata dal CD16, poiché la sua attività aumenta significativamente entro pochi minuti dall'ingaggio del recettore.

Gli esperimenti di citotossicità, in particolare di *redirect killing*, hanno dimostrato che l'inibizione dell'enzima PC-PLC provoca un blocco dell'attività citolitica CD16-mediata, oltre che della citotossicità naturale; mentre non ha alcun effetto sui pathway litici di altri recettori attivatori, come ad esempio NKp46. È interessante notare che, sebbene i due recettori presentino entrambi le sequenze ITAM nella porzione intracellulare (O' Shea et al., 1991; Sivori et al., 1997), soltanto il CD16 viene down-modulato dalla superficie cellulare a seguito dell'inibizione dell'enzima PC-PLC. Questo suggerisce l'esistenza di due pathway di trasduzione del segnale distinti per il recettore CD16 e per NKp46, e che probabilmente la PC-PLC sia implicata solo in quello del CD16.

L'inefficienza delle cellule NK a lisare cellule bersaglio

potrebbe essere attribuita sia alla totale scomparsa del CD16 dalla membrana plasmatica sia dalla necessità di avere molecole di PC-PLC attive sulla superficie cellulare. Infatti, se l'enzima non giocasse un ruolo fondamentale nei meccanismi litici, il grado di lisi specifica in presenza dell'inibitore D609 dovrebbe rimanere agli stessi livelli di quello misurato nella citotossicità naturale, mentre i dati ottenuti mostrano una sostanziale riduzione.

E' stato anche dimostrato che la formazione dei coniugati tra cellula NK e cellula target non è influenzata dall'inibizione e dalla conseguente down-modulazione della PC-PLC dalla membrana plasmatica. Ciò conferma quanto osservato negli esperimenti di citofluorimetria a flusso, in cui è evidente che il D609 ha un effetto specifico solo sull'espressione del recettore CD16, senza indurre una down-regolazione di molecole di adesione, come il CD56, dalla membrana cellulare.

Gli studi tuttora in corso nel nostro laboratorio sono volti all'individuazione degli *steps* della cascata di trasduzione del segnale innescata dal CD16 in cui l'enzima PC-PLC è coinvolto. A questo riguardo, esistono numerose evidenze che l'inibizione della PC-PLC, da parte del D609, possa interferire con il *signaling* di alcuni recettori bloccando l'attivazione delle protein-chinasi attivate da mitogeni (MAPK), in risposta a specifici ligandi (Li et al., 2006).

Recentemente, è anche stato dimostrato che l'attivazione dei linfociti B stimolati attraverso il recettore CD38 dipende dall'attivazione dell'enzima PC-PLC (Moreno-García et al., 2005). Il CD38 è anche implicato nel controllo di specifici

pathway di trasduzione sia in linfociti T che in cellule NK, in queste ultime, inoltre, sembra essere associato fisicamente e dipendere funzionalmente dal complesso recettoriale del CD16 (Ausiello et al., 1996; Deraglio et al., 2002). Queste osservazioni supportano indirettamente l'ipotesi che nelle cellule NK l'enzima PC-PLC possa svolgere un ruolo fondamentale nel regolare l'attivazione cellulare mediata dal recettore CD16.

Da anni esiste un dibattito piuttosto acceso sull'esistenza dell'enzima PC-PLC, poichè non è stato ancora isolato il gene di mammifero nè è stato clonato, e sul suo ruolo funzionale distinto da quello della sfingomielin sintasi (SMS), che è stato proposto come il solo enzima in grado di mediare gli effetti biologici attribuiti alla PC-PLC (Luberto & Hannun, 1998).

I nostri risultati mostrano chiaramente che, nelle nostre condizioni sperimentali, l'attività della SMS non viene aumentata a seguito della stimolazione del recettore CD16, e che il D609 non inibisce questo enzima, almeno nei tempi considerati per la misurazione dell'attività della PC-PLC.

Nelle stesse condizioni sperimentali nemmeno la PC-PLD, l'altro enzima coinvolto nel ciclo della fosfatidilcolina, viene inibito dal D609.

Alla luce di questi risultati, è possibile ipotizzare che nelle cellule NK gli enzimi PC-PLC e SMS siano deputati a differenti pathway metabolici, innescati da diversi tipi di attivazione cellulare e che la loro attività enzimatica sia temporalmente separata dopo stimolazione del recettore CD16, sebbene possano condividere alcune caratteristiche biochimiche e biologiche.

5. BIBLIOGRAFIA

Anderson P., Caligiuri M., O'Brien C., Manley T., Ritz J. and Schlossman S.F. Fc γ receptor type III (CD16) is included in the ζ NK receptor complex expressed by human natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990, **87**: 2274-2279

Andrei C., Margiocco P., Poggi A., Lotti L.V., Torrisi M.R., and Rubarteli A. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: implications for inflammatory processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004, **101**: 9745-9750

Ausiello C. M., la Sala A., Ramoni C., Urbani F., Funaro A., and Malavasi F. Secretion of IFN-gamma, IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-10 cytokines after activation of human purified T lymphocytes upon CD38 ligation. *Cell Immunol.* 1996, **173**: 192-197.

Azzoni L., Kamoun M., Salcedo T.W., Kanakaraj P. and Perussia B. Stimulation of Fc- γ RIIIA results in phospholipase C- γ 1 tyrosine phosphorylation and p56^{lck} activation. *J. Exp. Med.* 1992, **176**: 1745-1755

Balaji K.N., Schaschke N., Machleidt W., Catalfamo M., and Henkart P.A. Surface cathepsin B protects cytotoxic T lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J. Exp. Med.* 2002, **196**: 493-503

Balboa M.A., Balsinde J., Aramburu J., Mollinedo F., and Lopez-Botet M. Phospholipase D activation in human natural killer cells through the Kp43 and CD16 surface antigens takes place by different mechanism: involvement of the phospholipase D pathway in tumor necrosis factor α synthesis. *J. Exp. Med.* 1992, **176**: 9-17

Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., and Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999, **285**: 727-729

Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspect. *Ann. Rev. Immunol.* 1994, **12**: 735-773

Berridge M.J. and Irvine R.F. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989, **341**: 197-205

Billah M.M., Eckel S., Mullmann T.J., Egan R.W., and Siegel M.I. Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. Involvement of phosphohydrolase in signal transduction. *J. Biol. Chem.* 1989, **264**: 17069-17077

- Bonnema J.D., Karnitz L.M., Schoon R.A., Abraham R.T. and Leibson P.J. Fc receptor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase in natural killer cells is associated with protein kinase C-independent granule release and cell-mediated cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 1994, **180**: 1427-1435
- Borrego F., Ulbrecht M., Weiss E.H., Coligan J.E., and Brooks A.G. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J. Exp. Med.* 1998, **187**: 813-818
- Boyum A. Separation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968, **21**: 1-7
- Braud V.M., Allan D.S., O'Callaghan C.A., Söderström K., D'Andrea A., Ogg G.S., Lazetic S., Young N.T., Bell J.I., Phillips J.H., Lanier L.L., and McMichael A.J. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998, **391**: 795-799
- Brown F.D., Thomson N., Saqib K.M., Clark J.M., Powner D., Thomson N.T., Solari R., and Wakelam M.J. Phospholipase D1 localises to secretory granules and lysosomes and is plasma-membrane translocated on cellular stimulation. *Curr. Biol.* 1998, **8**: 835-838
- Brumbaugh K.M., Binstadt B.A., Billadeau D.D., Schoon R.A., Dick C.J., Ten R. and Leibson P.J. Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 1997, **186**: 1965-1973
- Bryceson Y.T., March M.E., Ljunggren H., and Long E.O. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol. Rev.* 2006a, **214**: 73-91
- Burnet F.M. The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* 1970, **13**: 1-27
- Burshtyn D.N., Scharenberg A.M., Wagtmann N., Rajagopalan S., Berrada K., Yi T., Kinet J.P., and Long E.O. Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* 1996, **4**: 77-85
- Callewaert, D. M., Radcliff, G., Waite, R., Le Fevre, J., and Poulik, M. D. Characterization of effector-target conjugates for cloned human natural killer and human lymphokine activated killer cells by flow cytometry. *Cytometry.* 1991. **12**: 666-676.
- Campbell J.J., Qin S., Unutmaz D., Soler D., Murphy K.E., Hodge M.R., Wu L., and Butcher E.C. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J. Immunol.* 2001, **166**: 6477-6482

- Campbell K.S., Dessing M., Lopez-Botet M., Cella M., and Colonna M. Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J. Exp. Med.* 1996, **184**: 93-100
- Cantoni C., Bottino C., Vitale M., Pessino A., Augugliaro R., Malaspina A., Parolini S., Moretta L., Moretta A. and Biassoni R. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J. Exp. Med.* 1999, **189**: 787-795
- Chang C., Rodriguez A., Carretero M., Lopez-Botet M., Phillips J.H., and Lanier L.L. Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *Eur. J. Immunol.* 1995, **25**: 2433-2437
- Choudhury G.G., Sylvia V.L. and Sakaguchi A.Y. Activation of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C by colony stimulation factor 1 receptor requires tyrosine phosphorylation and a guanine nucleotide-binding protein. *J. Biol. Chem.* 1991, **266**: 23147-23151
- Chow S.C., Ng J., Nordstedt C., Fredholm B.B., and Jondal M. Phosphoinositide breakdown and evidence for protein kinase C involvement during human NK killing. *Cell. Immunol.* 1988, **114**: 96-103
- Cifone M.G., Roncaioli P., Cironi L., Festuccia C., Meccia A., D'Alò S., Botti D., and Santoni A. NKR-P1A stimulation of arachidonate-generating enzymes in rat NK cells is associated with granule release and cytotoxic activity. *J. Immunol.* 1997, **159**: 309-317
- Clark M.A., Shorr R.G.L. and Bomalaski J.S. Antibodies prepared to *Bacillus cereus* phospholipase C crossreact with a phosphatidylcholine preferring phospholipase C in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986, **140**: 114-119
- Colley W.T., Sung T.C., Roll R., Jenco J., Hammond S.M., Altshuler Y., Bar-Sagi D., Morris A.J., and Frohman M.A. Phospholipase D2, a PLD1-related isoform with novel regulatory properties and discrete subcellular localization that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr. Biol.* 1997, **7**: 191-201
- Cooper M.A., Fehinger T.A., and Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001, **22**: 633-640
- Cuschieri J., Billgren J., and Maier R.V. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC) is required for LPS-mediated macrophage activation through CD14. *J. Leuk. Biol.* 2006, **80**: 407-414
- Deaglio S., Zubiatur M., Gregorini A., Bottarel F., Ausiello C. M., Dianzani U., Sancho J., and Malavasi F. Human CD38 and CD16 are functionally

dependent and physically associated in natural killer cells. *Blood* 2002, **99**: 2490-2498.

Deem R.L., Britvan L.J., and Targan S.R. Definition of a secondary target cell trigger during natural killer cell cytotoxicity: possible role of phospholipase A₂. *Cell. Immunol.* 1987, **110**: 253-264

Derby, E., Reddy, V., Baseler, M., and Malyguine, A. Flow cytometric assay for the simultaneous analysis of cell-mediated cytotoxicity and effector cell phenotype. *Biotechniques.* 2001, **31**: 660-665

Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., and Schreiber R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 2002, **3**: 991-998

Durand F., Brenier-Pinchart M.P., Berger F., Marche P.N., Grillot R., and Pelloux H. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C but not gamma interferon regulate gene expression and secretion of CC Chemokine Ligand-2 (CCL-2) by human astrocytes during infection by *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 2004, **26**: 419-422

Einspahr K.J., Abraham R.T., Binstadt B.A., Uehara Y. and Leibson P.J. Tyrosine phosphorylation provides an early and requisite signal for the activation of natural killer cell cytotoxic function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, **88**: 6279-6287

Exton J.H. Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.* 1990, **265**: 1-4

Exton J.H. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1994, **1212**: 26-42

Exton J.H. Phospholipase D-structure, regulation and function. *Rev. Physiol. Biochem Pharmacol.* 2002, **144**: 1-94

Fan Y., Yang B., and Wu C. Phenotypically and functionally distinct subsets of natural killer cells in human PBMCs. *Cell Biol. Int.* 2007, **7**: 1-10

Fanger N.A., Borges L., and Cosman D. The leukocyte immunoglobulin-like receptors (LIRs): a new family of immune regulators. *J. Leukoc. Biol.* 1999, **66**: 231-236

Fanger N.A., Cosman D., Peterson L., Braddy S.C., Maliszewski C.R., and Borges L. The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur. J. Immunol.* 1998, **28**: 3423-3434

Fantuzzi L., Spadaro F., Purificato C., Cecchetti S., Podo F., Belardelli F., Gessani S., and Ramoni C. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C

activation is required for CCR5-dependent, NF- κ B-driven CCL2 secretion elicited in response to HIV-1 gp120 in human primary macrophages. *Blood* 2008, *in press*

Ferlazzo G., Thomas D., Lin S.L., Goodman K., Morandi B., Muller W.A., Moretta A., and Munz C. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J. Immunol.* 2004, **172**: 1455-1462

Galandrini R., De Maria R., Piccoli M., Frati L., and Santoni A. CD44 triggering enhances human NK cell cytotoxic functions. *J. Immunol.* 1994, **153**: 4399-4407

Galandrini R., Palmieri G., Piccoli M., Frati L. and Santoni A. Role for the Rac1 exchange factor Vav in the signaling pathways leading to NK cell cytotoxicity. *J. Immunol.* 1999, **162**: 3148-3156

Galandrini R., Tassi I., Morrone S., Lanfrancone L., Pelicci P., Piccoli M., Frati L., and Santoni A. SH2-containing inositol phosphatase (SHIP-1) transiently translocates to raft domains and modulates CD16-mediated cytotoxicity in human NK cells. *Blood.* 2002, **100**: 4581-4589.

Glaser K.B., Mobilio D., Chang J.Y., and Senko N. Phospholipase A₂ enzymes: regulation and inhibition. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993, **14**: 92-98

Goebeler M., Gillitzer R., Kilian K., Utzel K., Bröcker E.B., Rapp U.R., and Ludwig S. Multiple signaling pathways regulate NF- κ B-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. *Blood.* 2001, **97**: 46-55

Grove R.I., Allegretto N.J., Kiener P.A., and Warr G.A. Lipopolysaccharide (LPS) alters phosphatidylcholine metabolism in elicited peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 1990, **48**: 38-44

Henkart P. and Yue C.C. The role of cytoplasmic granules in lymphocyte cytotoxicity. *Prog. Allergy* 1988, **40**: 82-110

Jacobs R., Hintzen G., Kemper A., Beul K., Kemp S., Behrens G., Sykora K.W., and Schmidt R.E. CD56 bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56 dim NK cells. *Eur. J. Immunol.* 2001, **31**: 3121-3127

Jevremovic D., Billadeau D.D., Schoon R.A., Dick C.J., Irvin B.J., Zhang W., Samelson L.E., Abraham R.T. and Leibson P.J. A role for the adaptor protein LAT in human NK cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 1999, **162**: 2453-2461

Johansen T., Holm T., Guddal P.H., Sletten K., Haugli F.B., and Little C. Cloning and sequencing of the gene encoding the phosphatidylcholine-preferring phospholipase C of *Bacillus cereus*. *Gene* 1988, **65**: 293-304

Julius M.H., Simpson E., and Hezerberg L.A. A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1973, **3**: 645-648

Kennerly D.A. Phosphatidylcholine is a quantitatively more important source of increased 1,2-diglycerol than is phosphatidylinositol in mast cells. *J. Immunol.* 1990, **144**: 3912-3919

Kusner D.J., Hall C.F., and Jackson S. FC γ receptor-mediated activation of phospholipase D regulates macrophage phagocytosis of IgG-opsonized particles. *J. Immunol.* 1999, **162**: 2266-2274

Lacal J.C., Moscat J., and Aaronson S.A. Novel source of 1,2-diacylglycerol elevated in cells transformed by Ha-ras oncogene. *Nature* 1987, **330**: 269-272

Lanier L.L., Chang C., Azuma M., Ruitenberg J.J., Hemperly J.J., and Phillips J.H. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J. Immunol.* 1991, **146**: 4421-4426

Lanier L.L., Kipps T.J., and Phillips J.H. Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3⁺ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). *J. Exp. Med.* 1985, **162**: 2089-2106

Larrodera P., Cornet M.E., Diaz-Meco M.T., Lopez-Barahona M., Diaz-Laviada I., Guddal P.H., Johansen T., and Moscat J. Phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphatidylcholine is an important step in PDGF-stimulated DNA synthesis. *Cell* 1990, **61**: 1113-1120

LeDrean E., Vely F., Olcese L., Cambiaggi A., Guia S., Krystal G., Gervois N., Moretta A., Jotereau F., and Vivier E. Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases. *Eur. J. Immunol.* 1998, **28**: 264-276

Lennartz M.R. Phospholipase and phagocytosis: the role of phospholipid-derived second messengers in phagocytosis. *Internat. J. Biochem. Cell. Biol.* 1999, **31**: 415-430

Li F., Wu N., Su R.B., Zheng J. Q., Xu B., Lu X. Q., Cong B., and Li J. Involvement of phosphatidylcholine-selective phospholipase C in activation of mitogen-activated protein kinase pathways in imidazole receptor antisera-selected protein. *J. Cell. Biochem.* 2006, **98**: 1615-28

Lichtenheld M.G., Olsen K.J., Lu P., Lowrey D.M., Hameed A., Hengartner H., and Podack E.R. Structure and function of human perforin. *Nature* 1988, **335**: 448-451

- Liscovitch M. Crosstalk among multiple signal-activated phospholipase. *Trends in Biochem. Sci.* 1992, **17**: 393-399
- Liscovitch M., Czarny M., Fiucci G., and Tang X. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J.* 2000, **345**: 401-415
- Ljunggren H.G. and Karre K. In search of the “missing self”. MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 1990, **11**: 237-244
- Lopez-Botet M., Llano M., Navarro F., and Bellón T. NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin. Immunol.* 2000, **12**: 109-119
- Lou, Z., Jevremovic, D., Billadeau, D. D., and Leibson, P. J., A balance between positive and negative signals in cytotoxic lymphocytes regulates the polarization of lipid rafts during the development of cell-mediated killing. *J. Exp. Med.* 2000, **191**: 347-354
- Luberto C., and Hannun, Y. A. Sphingomyelin synthase, a potential regulator of intracellular levels of ceramide and diacylglycerol during SV40 transformation. Does sphingomyelin synthase account for the putative phosphatidylcholine-specific phospholipase C? *J. Biol. Chem.* 1998, **273**: 14550-14559
- Martin-Fontecha A., Thomsen L.L., Brett S., Gerard C., Lipp M., Lanzavecchia A., and Sallusto F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat. Immunol.* 2004, **5**: 1260-1265
- Masson D., Peters P.J., Geuze H.J., Borst J., and Tschopp J. Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent on pH. *Biochemistry* 1990, **29**: 11229-11235
- Meng A., Luberto C., Meier P., Ba A., Yang X., Hannun Y.A., and Zhou D. Sphingomyelin synthase as a potential target for D609-induced apoptosis in U937 human monocytic leukemia cells. *Exp. Cell Res.* 2004, **292**: 385-392
- Milella M., Gismondi A., Roncaioli P., Bisogno L., Calmieri G., Frati L., Cifone M.G. and Santoni A. CD16 cross-linking induces both secretory and extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent cytosolic phospholipase A₂ (PLA₂) activity in human natural killer cells: involvement of ERK, but not PLA₂ in CD16 triggered granule exocytosis. *J. Immunol.* 1997, **158**: 3148-3154
- Milella M., Gismondi A., Roncaioli P., Calmieri G., Morrone S., Piccoli M., Frati L., Cifone M.G., and Santoni A. β 1 integrin cross-linking inhibits CD16-induced phospholipase D and secretory phospholipase A₂ activity and granule exocytosis in human NK cells: role of phospholipase D in CD16-triggered degranulation. *J. Immunol.* 1999, **162**: 2064-2072

- Mingari M.C., Poggi A., Biassoni R., Bellomo R., Ciccone E., Pella N., Morelli L., Verdini S., Moretta A., and Moretta L. In vitro proliferation and cloning of CD3-CD16+ cells from human thymocyte precursors. *J. Exp. Med.* 1991, **174**: 21-26
- Monick M.M., Carter A.B., Gudmundsson G., Mallampalli R., Powers L.S. and Hunninghake G.W. A phosphatidylcholine-specific phospholipase C regulates activation of p42/44 mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated human alveolar macrophages. *J. Immunol.* 1999, **162**: 3005-3012
- Moreno-García M.E., López-Bojórques L.N., Zentella A., Humphries L.A., Rawlings D.J., and Santos-Argumedo L. CD38 signaling regulates B lymphocyte activation via a phospholipase C (PLC)- γ 2-independent, protein kinase C, phosphatidylcholine-PLC, and phospholipase D-dependent signaling cascade. *J. Immunol.* 2005, **174**: 2687-2695
- Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Cantoni C., Mingari M.C., Biassoni R., and Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 2001, **19**: 197-223
- Moretta L., Bottino C., Pende D., Mingari M.C., Biassoni R., and Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur. J. Immunol.* 2002, **32**: 1205-1211
- Moscat J., Cornet M.E., Diaz-Meco M.T., Larrodera P., Lopez-Alañon D., and Lopez-Barahona M. Activation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in cell growth and oncogene transformation. *Biochem. Soc. Trans.* 1989, **17**: 988-991
- Mota G., Moldovan I., Calugar, A., Hirt M., Kozma E., Galatiuc C., Brasoveanu L., and Boltz-Nitulescu G. Interaction of human immunoglobulin G with CD16 on natural killer cells: ligand clearance, Fc γ RIIIA turnover and effects of metalloproteinases on Fc γ RIIIA-mediated binding, signal transduction and killing. *Scand. J. Immunol.* 2004, **59**: 278-84
- Nitta T., Yagita H., Sato K., and Okumura K. Involvement of CD56 (NKG-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J. Exp. Med.* 1989, **170**: 1757-1761
- O' Shea J.J., Weissman A.M., Kennedy I.C.S. and Ortaldo J.R. Engagement of the natural killer cell IgG Fc receptor results in tyrosine phosphorylation of the ζ chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, **88**: 350-354
- Oshimi Y., Oda S., Honda Y., Nagata S., and Miyazaki S. Involvement of ligand and fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J. Immunol.* 1996, **157**: 2909-2915

Paolini R., Molfetta R., Piccoli M., Frati L. and Santoni A. Ubiquitination and degradation of Syk and ZAP-70 protein tyrosine kinases in human NK cells upon CD16 engagement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001, **98**: 9611-9616

Parolini, I., Sargiacomo, M., Lisanti, M. P, and Peschle, C. Signal transduction and glycosphosphatidylinositol-linked proteins (lyn, lck, CD4, CD45, G proteins, and CD55) selectively localize in Triton-insoluble plasma membrane domains of human leukemic cell lines and normal granulocytes. *Blood.* 1996. **87**: 3783-94

Pelech S.L. and Vance D.E. Signal transduction via phosphatidylcholine cycles. *Trends Biochem. Sci.* 1989, **14**: 28-30

Pende D., Biassoni R., Cantoni C., Verdini S., Falco M., Di Donato C., Accade L., Bottino C., Moretta A., and Moretta L. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140 kDa disulfide-linked dimer. *J. Exp. Med.* 1996, **184**: 505-518

Pende D., Cantoni C., Rivera P., Vitale M., Castriconi R., Marcenaro S., Nanni M., Biassoni R., Bottino C., Moretta A., and Moretta L. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur. J. Immunol.* 2001, **31**: 1076-1086

Pende D., Parolini S., Pessino A., Sivori S., Augulgiaro R., Morelli L., Marcenaro E., Accade L., Malaspina A., Biassoni R., Bottino C., Moretta L. and Moretta A. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 1999, **190**: 1505-1516

Perussia B. and Ravetch J.V. Fc γ RIII (CD16) on human macrophages is a functional product of Fc γ RIII-2 gene. *Eur. J. Immunol.* 1991, **21**: 425-429

Perussia B., Acuto O., Terhorst C., Faust J., Lazarus R., Fanning V., and Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J. Immunol.* 1983b, **130**:2142-2148

Perussia B., Starr S., Abraham S., Fanning V., and Trinchieri G. Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1 *J. Immunol.* 1983a, **130**: 2133-2141

Perussia B., Trinchieri G., Jackson A., Warner N.L., Faust J., Rumpold H., Kraft D., and Lanier L.L. The Fc receptor for IgG on human natural killer

cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *J. Immunol* 1984, **133**: 180-189

Pessin M.S., Baldassarre J.J., and Raben D.M. Molecular species analysis of mitogen-stimulated 1,2-diglycerides in fibroblasts. Comparison of alpha-thrombin, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor. *J. Biol. Chem.* 1990, **265**:7959-7966

Pessino A., Sivori S., Bottino C., Malaspina A., Morelli L., Moretta L., Biassoni R. and Moretta A. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 1998, **188**: 953-960

Podo F., Ferretti A., Knijn A., Zhang P., Ramoni C., Barletta B., Pini C., Baccarini S. and Pulciani S. Detection of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in NIH-3T3 fibroblasts and their H-ras transformants: NMR and immunochemical studies. *Anticanc. Res.* 1996, **16**: 1399-1412

Price B.D., Morris J.D.H., Marshall C.J., and Hall A. Stimulation of phosphatidylcholine hydrolysis, diacylglycerol release, and arachidonic acid production by oncogenic ras is a consequence of protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* 1989, **264**: 16638-16643

Qualmann B., and Kessels M. M. Endocytosis and the cytoskeleton. *Int. Rev. Cytol.* 2002, **220**: 93-144

Ramoni C., Spadaro F., Barletta B., Dupuis M.L., and Podo F. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C in mitogen-stimulated fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 2004, **299**: 370-382

Ramoni C., Spadaro F., Menegon M., and Podo F. Cellular localization and functional role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in NK cells. *J. Immunol.* 2001, **167**: 2642-2650

Ravetch J.V. and Perussia B. Alternative membrane forms of FcγRIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils: cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J. Exp. Med.* 1989, **170**: 481-497

Rhee S.G., and Bae Y.S. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 1997, **272**: 15045-15048

Rizzo M.A., Shome K., Vasudevan C., Stolz D.V., Sung T.C., Frohman M.A., Watkins S.C., and Romero G. Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 1999, **274**: 1131-1139

Rodewald H.R., Moingeon P., Lucich J.L., Dosiou C., Lopez P., and Reinherz E.L. A population of early fetal thymocytes expressing Fc γ RII/III contains precursors of T lymphocytes and natural killer cells. *Cell*. 1992, **69**: 139-149

Schaloske R.H., and Dennis E.A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006, **1761**: 1246-1259

Schutze S., Potthoff K., Machleidt T., Berkovic D., Wiegmann K., and Kronke M. TNF activates NF- κ B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell* 1992, **71**: 765-776

Sheikhnejad R.G. and Srivastava P.N. Isolation and properties of a phosphatidylcholine-specific phospholipase C from bull seminal plasma. *J. Biol. Chem*. 1986, **261**: 7544-7549

Siddhanta A., and Shields D. Secretory vesicle budding from the trans-golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J. Biol. Chem*. 1998, **273**: 17995-17998

Simons K., and Toomre D., Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 2000, **1**: 31-39

Sivori S., Cantoni C., Parolini S., Marcenaro E., Conte R., Moretta L., and Moretta A. IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. *Eur. J. Immunol*. 2003, **33**: 3439-3447

Sivori S., Vitale M., Morelli L., Sanseverino L., Augugliaro R., Bottino C., Moretta L. and Moretta A. P46, a novel natural killer cell-specific surface molecule which mediates cell activation. *J. Exp. Med*. 1997, **186**: 1129-1136

Spadaro F., Cecchetti, S., Sanchez M., Podo F., and Ramoni C., Expression and role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in human NK and T lymphocyte subsets. *Eur. J. Immunol*. 2006. **36**: 3277-3287

Steele T.A. and Brahmi Z. Phosphatidylinositol metabolism accompanies early activation events in tumor target cell-stimulated human natural killer cells. *Cell. Immunol*. 1988, **112**: 402-413

Stewart, C. A., Vivier, E., and Colonna, M. Strategies of natural killer cell recognition and signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 2006. **298**: 1-21

Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J. Biol. Med*. 1982, **55**: 329-333

Ting A.T., Karnitz L.M., Schoon R.A., Abraham R.T. and Leibson P.J. Fc γ receptor activation induces the tyrosine phosphorylation of both

- phospholipase C (PLC)- γ 1 and PLC- γ 2 in natural killer cells. *J. Exp. Med.* 1992, **176**:1751-1759
- Trapani J.A. and Smyth M.J. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2002, **2**: 735-747
- Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 1989, **47**: 176-187
- Tschopp J., Schäfer S., Masson D., Peitsch M.C., and Hensser C. Phosphorylcholine acts as a Ca²⁺-dependent receptor molecule for lymphocyte perforin. *Nature.* 1989, **337**: 272-274
- Uellner R., Zvelebil M.J., Hopkins J., Jones J., MacDougall L.K., Morgan B.P., Podack E., Waterfield M.D., and Griffiths G.M. Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *Embo J.* 1997, **16**: 7287-7296
- Valitutti S., Muller S., Salio M., and Lanzavecchia A., Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J. Exp. Med.* 1997, **185**: 1859-1864
- Vitale M., Bottino C., Sivori S., Sanseverino L., Castriconi R., Marcenaro R., Augugliaro R., Moretta L. and Moretta A. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells is involved in non-MHC restricted tumor cell lysis. *J. Exp. Med.* 1998, **187**: 2065-2072
- Vivier E., Morin P., O'Brien C., Drucker B., Schlossman S. F., and Anderson P. Tyrosine phosphorylation of the Fc γ RIII (CD16): ζ complex in human natural killer cells. *J. Immunol.* 1991, **146**: 206-210
- Weiss A. and Littman D.R. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* 1993, **76**: 263-274
- Werfel T., Uciechowski P., Tetteroo P.A., Kurrle R., Deicher H., and Schmidt R.E. Activation of cloned human natural killer cells via Fc gamma RIII. *J. Immunol.* 1989, **142**: 1102-1106
- Whalen M.M, Doshi R.N., Homma Y., and Bankhursr A.D. Phospholipase C activation in the cytotoxic response of human natural killer cells requires protein-tyrosine kinase activity. *Immunology* 1993, **79**: 542-547
- Wolf R.A. and Gross R.W. Identification of neutral active phospholipase C which hydrolyzes choline glycerophospholipids and plasmalogen selective phospholipase A2 in canine myocardium. *J. Biol. Chem.* 1985, **260**: 7295-7303

Wu J., Song Y., Bakker A.B.H., Bauer S., Spies T., Lanier L.L., and Phillips J.H. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999, **285**: 730-738

Yedgar S., Cohen Y., and Shoseyov D. Control of phospholipase A2 activities for the treatment of inflammatory conditions. *Biochim Biophys Acta*. 2006, **1761**:1373-82

Yokoyama W.M. and Kim S. How do natural killer cells find self to achieve tolerance. *Immunity* 2006, **24**: 249-257

Elenco pubblicazioni

F. Spadaro, S. Cecchetti, M. Sanchez, F. Podo, C. Ramoni.

“Expression and role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in human NK and T lymphocyte subsets”. (Eur. J. Immunol. 2006. 36: 3277-3287)

S. Cecchetti, F. Spadaro, L. Lugini, F. Podo, C. Ramoni.

“Functional role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in regulating CD16 membrane expression in Natural Killer cells”. (Eur. J. Immunol. 2007. 37: 2912-2922).

L. Fantuzzi, F. Spadaro, C. Purificato, S. Cecchetti, F. Podo, F. Belardelli, S. Gessani, C. Ramoni.

“Phosphatidylcholine-specific phospholipase C activation is required for CCR5-dependent, NF-kB-driven CCL2 secretion elicited in response to HIV-1 gp120 in human primary macrophages”. (Blood 2008. *in press*).