

# **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FIRENZE**

**DIPARTIMENTO DI FISIOPATOLOGIA CLINICA  
UNITÀ DI ENDOCRINOLOGIA**

**Tesi di Dottorato di Ricerca in  
Scienze Endocrinologiche e Metaboliche  
XXI Ciclo-2005/2008**

*“Studio dei meccanismi molecolari alla base  
degli effetti pro-infiammatori di  $TNF\alpha$  e  
IFN $\gamma$  e dell'azione anti-infiammatoria dei  
tiazolidinedioni, in un modello in vitro di  
cellule endoteliali umane”*

Docente Guida:

Prof.ssa Michaela Luconi

Dottorando:

Dr.ssa Adriana Lombardi

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Gianni Forti

<i>RINGRAZIAMENTI</i> .....	1
INTRODUZIONE.....	3
1.1 L'endotelio: struttura e funzioni.....	3
1.2 Modelli in vitro.....	6
1.3 Eterogeneità tra cellule endoteliali .....	7
1.4 Infiammazione.....	9
1.5 Endotelio e immunità adattativa: interazioni ECs-leucociti .....	9
1.6 Endotelio e immunità naturale .....	13
1.7 Ruolo di endotelio e infiammazione nell'insorgenza di malattie vascolari e disfunzioni immunitarie: implicazioni terapeutiche .....	14
1.8 Citochine infiammatorie :TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$ .....	18
1.9 TNF $\alpha$ e vie di trasduzione del segnale .....	19
1.9.1 Attivazione di NF- $\kappa$ B .....	21
1.9.2 Attivazione di AP-1 .....	22
1.10 TNF-R1 e TNF-R2 .....	23
1.11 IFN $\gamma$ ed attivazione macrofagica.....	24
1.11.1 IFNR e meccanismo di trasduzione del segnale ("Jak-STAT pathway") .....	25
1.11.2 I fattori trascrizionali STAT.....	27
1.12 Sviluppo della risposta infiammatoria di tipo Th1 .....	27
1.13 Differenziamento dei linfociti Th.....	28
1.14 Le chemochine .....	31
1.15 Le chemochine IFN $\gamma$ -inducibili.....	32
1.16 Ruolo dei ligandi di CXCR3 nel rigetto da allotrapianto .....	34
1.17 Ruolo dei ligandi di CXCR3 nelle patologie endocrine autoimmuni.....	36
1.18 Fractalkina.....	37
1.19 I tiazolidinedioni.....	39
1.20 PPARs e loro caratteristiche strutturali.....	39
1.21 Ligandi sintetici ed endogeni di PPAR $\gamma$ .....	40

1.22	Meccanismi di regolazione della trascrizione genica PPAR $\gamma$ -dipendenti	41
1.23	“Crosstalk” tra PPAR $\gamma$ e ERK1/2	43
1.24	Effetti insulino-sensibilizzanti dei ligandi di PPAR $\gamma$	44
1.25	Meccanismi PPAR $\gamma$ -indipendenti	46
1.26	Effetti antineoplastici dei ligandi di PPAR $\gamma$	48
1.27	Effetti anti-infiammatori dei ligandi di PPAR $\gamma$	49
1.28	PPAR $\gamma$ all’interfaccia tra metabolismo e infiammazione	52
	OBIETTIVO DELLA RICERCA	52
	MATERIALI E METODI	54
2.1	Reagenti	54
2.2	Colture cellulari	55
2.3	Protocollo sperimentale	55
2.4	Saggio MTS per la determinazione della vitalità cellulare	55
2.5	Determinazione della concentrazione proteica	56
2.6	Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide (SDS-page)	56
2.7	Analisi Western blot	57
2.8	Immunocitochimica	58
2.9	Microscopia confocale a immunofluorescenza	58
2.10	Analisi citofluorimetrica	59
2.11	Silenziamento genico	60
2.12	Trasfezione cellulare con vettori virali ricombinanti	60
2.13	Determinazione dei livelli di secrezione citochinica mediante ELISA	61
2.14	Real Time Quantitative RT-PCR	61
2.15	Analisi Statistica	62
	RISULTATI	64
3.1	Azione sinergica di TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$ sulla secrezione di IP-10	64
3.2	Azione inibitoria del RGZ sulla secrezione di IP-10 indotta dal TNF $\alpha$ e dall’IFN $\gamma$	68

3.3	L'effetto inibitorio del RGZ sulla risposta infiammatoria indotta da TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$ è mediato dall'inibizione di ERK1/2.....	70
3.4	Il sinergismo tra TNF $\alpha$ ed IFN $\gamma$ non è solo coinvolto nella “up-regulation” dell'IP-10 ma anche di altre citochine/chemochine caratterizzanti la risposta infiammatoria .....	84
3.5	L'azione anti-infiammatoria del RGZ non è limitata all'inibizione dell'IP-10: effetti su altre citochine/chemochine caratterizzanti la risposta infiammatoria .....	86
3.6	Azione del RGZ sulle molecole di adesione .....	88
3.7	Meccanismi molecolari sottostanti l'azione sinergica di TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$ ..	89
3.8	IFN $\gamma$ e TNF $\alpha$ determinano una reciproca “up-regulation” del TNF-R2 e del IFNR .....	94
3.9	Studi sul possibile coinvolgimento di PPAR $\gamma$ nel mediare gli effetti inibitori del RGZ sulla risposta citochinica/chemochinica indotta dal TNF $\alpha$ e dall'IFN $\gamma$ .....	97
	DISCUSSIONE.....	106
	BIBLIOGRAFIA .....	117



## ***Ringraziamenti***

I risultati qui di seguito illustrati non sarebbero stati raggiunti senza la guida, il sostegno e l'attiva collaborazione di un nutrito gruppo di persone che ho il dovere, ma soprattutto il piacere, di ringraziare.

Vorrei iniziare con il ringraziare la Prof.ssa Michaela Luconi, per noi tutti Michaela, che in questi tre anni ha guidato il mio lavoro con pazienza ed entusiasmo, e che ha, più di ogni altro, contribuito alla mia formazione scientifica ed umana. Non esagero se dico che è stata un vero punto di riferimento e che mi sento molto fortunata di aver potuto lavorare con lei, non solo perché ho imparato molto, ma anche perché mi ha dato l'opportunità di lavorare in un ambiente sereno e continuamente stimolante.

Sentiti ringraziamenti vanno al Prof. Mario Serio, coordinatore del Dottorato di ricerca in Scienze Endocrinologiche e Metaboliche e Direttore uscente del Dipartimento di Fisiopatologia Clinica dell'Università di Firenze, per il vivo interesse con cui ha seguito le nostre ricerche, per il continuo sostegno e i preziosi consigli.

Vorrei poi ringraziare la Dr.ssa Elisabetta Piscitelli che mi ha seguito “nei miei primi passi in laboratorio” e che, pur non lavorando più con noi, ricordo con affetto.

È con grande piacere che ringrazio tutto il gruppo di lavoro della sezione di Endocrinologia: la Dr.ssa Giulia Cantini, una bravissima collega e una cara amica, il cui aiuto è sempre stato prezioso e senza la quale le lunghe ore trascorse in laboratorio sarebbero state certamente più dure e tristi; la Dr.ssa Giada Poli per la “spontanea e contagiosa simpatia”, fondamentale a tenere alto il morale nel momento del bisogno; la Dr.ssa Michela Francalanci per la sincera disponibilità e la continua collaborazione; la Dr.ssa Silvana Baglioni per la sollecita disponibilità ad insegnarmi cose nuove e per gli ottimi consigli; la Dr.ssa AnnaMaria Clemente per gli ottimi suggerimenti pratici e la prontezza nel fornire aiuto e

incoraggiamento; il Dr. Tonino Ercolino per lo humour e la solarità che allietano i nostri pranzi; il Dr. Gabriele Varano che pur essendo lontano ci è sempre vicino con il suo affetto amicizia e simpatia.

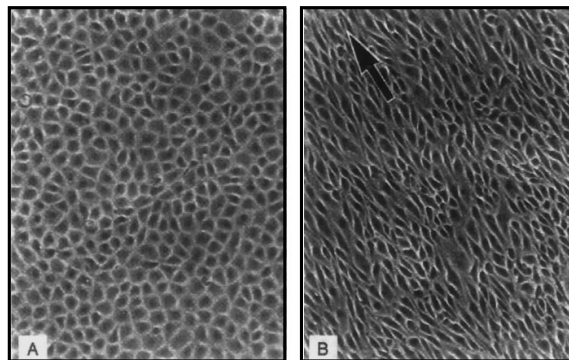
Spero davvero che questi brevi ringraziamenti siano riusciti a descrivere la profonda stima ed il grande affetto che ho verso tutte le persone che in questi anni hanno condiviso con me “le gioie e i dolori” della vita di laboratorio.

Vorrei poi sottolineare l'importanza delle collaborazioni, e ringraziare per i sostanziali contributi apportati dai gruppi della Sezione di Biochimica Clinica (Dr.ssa Stefania Gelmini), della Sezione di Gastroenterologia (Prof. Andrea Galli, Dr. Tommaso Mello, Dr. Elisabetta Ceni) e dal Dip. di Medicina Interna (Prof. Francesco Annunziato, Dr. Lorenzo Cosmi, Dr.ssa Veronica Santarlasci).

# Introduzione

## 1.1 L'endotelio: struttura e funzioni

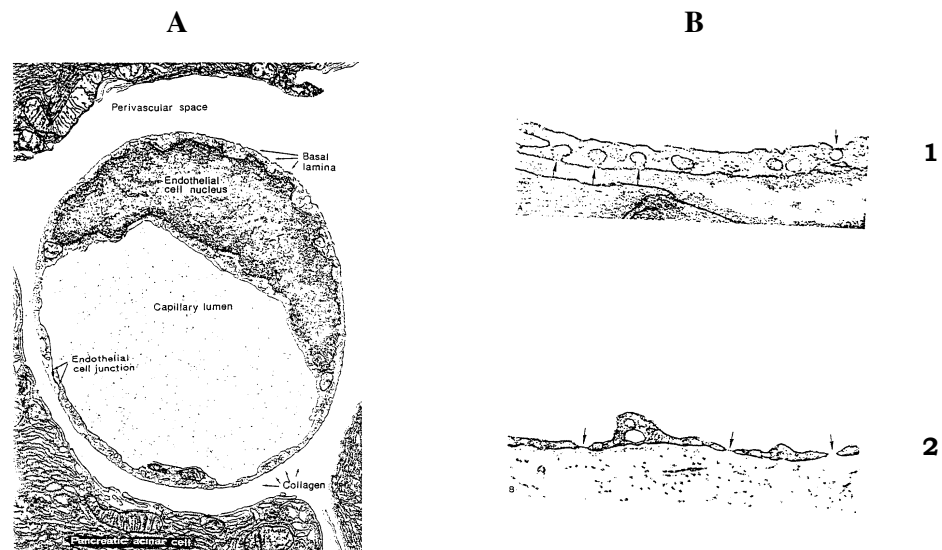
Tutti i vasi sanguigni, dalle arterie e vene di grosso calibro alle più piccole venule postcapillari, sono rivestiti, a livello della superficie interna, da un monostrato di cellule endoteliali (ECs) che nel loro insieme costituiscono l'endotelio vasale. L'endotelio è un sistema cellulare altamente specializzato composto da  $1-6 \times 10^{13}$  ECs che, in un uomo adulto, rivestono una superficie di  $4000-7000 \text{ m}^2$ (1). Le ECs hanno un aspetto poligonale, sono appiattite, e si dispongono con l'asse maggiore nella direzione del flusso sanguigno (Fig. 1).



**Fig.1:** Allineamento di ECs ottenuto, *in vitro*, in risposta a un flusso direzionale continuo. (A) Prima dell'esposizione allo stress da attrito (*shear stress*). (B) 24 ore dopo l'esposizione al flusso (*shear stress*,  $10 \text{ dynes/cm}^2$ ). Immagini tratte da Cines *et al.*(2).

Diversamente dall'endotelio che riveste i grossi vasi quello dei capillari può assumere morfologie spiccatamente diverse (Fig. 2): tipo sinusoidale (discontinuo), fenestrato, continuo o continuo con giunzioni serrate. I sinusoidi sono tipici del fegato, della milza e del midollo osseo, mentre villi intestinali, ghiandole endocrine e rene presentano un endotelio fenestrato che facilita una permeabilità

di tipo selettivo necessaria per un efficiente assorbimento, secrezione e filtraggio (2). A livello di muscolo e tessuto adiposo vi è un endotelio continuo, mentre la retina e il cervello hanno un endotelio a giunzioni strette che va a costituire la barriera emato-encefalica. L'endotelio poggia sulla tunica media attraverso la membrana basale, uno strato di sostanza amorfa costituita da materiale secreto dalle stesse ECs che vi aderiscono.



**Fig.2:** Eterogeneità delle ECs. Immagini di microscopia elettronica. (A) Giunzione tra due ECs di un capillare (pancreas di maialino d'india). (B) Differenze tra ECs provenienti da due tipi di capillari: (1) invaginazioni vescicolari (freccie) a livello dei versanti luminale e abluminale della membrana plasmatica di una EC di capillare muscolare; (2) capillare fenestrato della lamina propria del colon con sottili diaframmi (freccie) ricoprenti i pori della membrana plasmatica. Immagini tratte da Cines *et al.* (2).

Per oltre un secolo, le ECs sono state considerate una semplice barriera passiva ed inerte la cui funzione primaria era quella del mantenimento della permeabilità dei vasi. La visione attuale, avvalorata dalle numerose evidenze sperimentali succedutesi negli anni, attribuisce invece all'endotelio vasale un ruolo dinamico e funzioni di primaria importanza. L'endotelio, posizionato all'interfaccia tra il sangue ed i tessuti, gioca un ruolo chiave in numerosi processi sia fisiologici che patologici; è coinvolto nel trasporto di nutrienti e di molecole

biologicamente attive, nel metabolismo delle lipoproteine, nel mantenimento dell'omeostasi tissutale, nella regolazione del flusso sanguigno e del tono vasale e nel “*trafficking*” delle cellule immunitarie (2). La regolazione della pressione e del flusso sanguigno è attuata attraverso un modulato rilascio, da parte delle ECs, di molecole o ad azione vasodilatatoria, quali il monossido di azoto (NO) e la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (3), o ad azione vasocostrittoria quali l'endotelina (ET) e il PAF (*Platelet-Activating Factor*). Attraverso il mantenimento di un delicato equilibrio dinamico tra meccanismi anticoagulanti e pro-coagulanti, l'endotelio risponde a due esigenze opposte: da una parte prevenire eventi trombotici dall'altra rispondere prontamente o a traumi che ledano l'integrità dell'endotelio stesso o all'infiammazione. In circostanze normali l'endotelio costituisce una superficie non adesiva e anti-trombotica che, inibendo attivamente le interazioni cellula/cellula con leucociti e piastrine, garantisce un appropriato flusso sanguigno. Questo è reso possibile attraverso la secrezione, da parte delle ECs, di diverse sostanze vasoattive tra cui il NO e la PGI<sub>2</sub> che esercitano sulle piastrine un effetto antiaggregante, e il tPA (*tissue Plasminogen Activator*) che, portando all'attivazione della plasmina, esercita un'azione fibrinolitica nei confronti di eventuali micro-trombi. Inoltre, le ECs contribuiscono a contenere l'azione pro-coagulante della trombina attraverso l'espressione superficiale della trombomodulina (TM): il legame trombina-TM non solo riduce l'attività enzimatica della trombina (4) (serino-proteasi coinvolta nell'attivazione delle piastrine e di vari enzimi della coagulazione) ma favorisce anche l'attivazione della proteina C (PC), una potente molecola anti-infiammatoria (5) (Fig. 4). Le caratteristiche funzionali dell'endotelio cambiano drasticamente nel caso il sistema sia perturbato da un evento traumatico o dall'avvio di un processo infiammatorio: le ECs acquisiscono proprietà adesive, pro-trombotiche, e anti-fibrinolitiche. È fondamentale però che queste proprietà siano transitorie e che il sistema torni nelle condizioni normali. Quando questo non accade e perdura uno stato vaso-costrittorio, piastrino-aggregante, pro-infiammatorio con accumulo dei leucociti sull'endotelio, pro-trombotico e anti-fibrinolitico si parla di disfunzione

endoteliale (6). La disfunzione endoteliale è stata associata a varie patologie, all'ipertensione, alle vasculopatie da trapianto, al diabete di tipo 2 (7, 8), alla presenza di malattia coronarica (9); in particolare, è stato dimostrato che la disfunzione endoteliale può precedere le manifestazioni cliniche dell'aterosclerosi coronarica (10).

## **1.2 Modelli *in vitro***

Il crescente interesse sul ruolo dell'endotelio in condizioni fisiologiche e patologiche ha stimolato la ricerca di appropriati modelli *in vitro* per lo studio delle molteplici funzioni endoteliali. Le proprietà delle ECs possono variare considerevolmente a seconda della localizzazione e della dimensione dei vasi vascolari di origine (11). A questo proposito, una tra le più importanti differenze di cui occorre tener conto e che guida e condiziona la scelta del modello cellulare di studio, è quella esistente tra ECs derivanti dal macrocircolo e quelle appartenenti al microcircolo. Nonostante il letto microvascolare sia il più rappresentato a livello di un organismo, andando a coprire un'area circa 50 volte più grande di quella data dall'insieme di tutti i grandi vasi (12), la maggior parte delle attuali conoscenze sulle funzioni endoteliali si basano su studi condotti su un modello di macrocircolo, le HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*). Queste cellule non solo non riflettono la natura altamente specializzata delle ECs microvascolari ma derivano anche da un tipo di vaso che raramente è affetto dai più comuni disordini vascolari (2). Appare chiaro quindi come si sia reso necessario lo sviluppo di nuovi modelli cellulari che rispecchiassero maggiormente ciò che accade *in vivo*. Per alcuni tipi di studio è essenziale lavorare con ECs da coltura primaria: queste conservano maggiormente i tratti endoteliali tipici del tessuto di origine ma presentano diversi svantaggi, tra cui la difficoltà di isolamento, la variabilità tra preparazioni da donatori diversi, il tempo di mantenimento in coltura limitato (senescenza cellulare). Nel caso si voglia standardizzare le condizioni sperimentali per ottenere risultati riproducibili è più opportuno lavorare con linee di ECs immortalizzate e ben caratterizzate.

Comunque, occorre tener presente che la ricerca di un'ideale linea cellulare immortalizzata che conservi le proprietà delle cellule primarie senza manifestare alcuna caratteristica tumorale, è di per sé una contraddizione(13). ECs da microcircolo sono state isolate dalla placenta (14), dal derma (15), dall'intestino(16) dal tessuto adiposo (17) umani ma, ad oggi, non ne sono disponibili molte immortalizzate.

La linea cellulare delle HMEC-1 (*Human dermal Microvascular Endothelial Cells*-1) è la prima linea cellulare da microcircolo ad essere ampiamente diffusa: è stata ottenuta trasfettando ECs microvascolari da derma umano con un plasmide contenente la regione codificante per l'antigene T grande di SV40 (18). Le HMEC-1 mantengono le caratteristiche morfologiche, fenotipiche e funzionali di normali ECs da microcircolo: esprimono e secernono il vWF (*von Willebrand's Factor*), hanno un “*up-take*” delle LDL acetilate, hanno la capacità di formare rapidamente strutture tubolari quando cresciute su matrigel e in saggi di adesione legano specificamente i linfociti. Le HMEC-1 esprimono costitutivamente, o possono essere indotte ad esprimere, varie molecole di superficie quali VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*-1), ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule*-1) e la E-selectina (13) ed anche l'MHC (*Major Histocompatibility Complex*) di classe II, il CD31, il CD36, il CD44 (18).

### **1.3 Eterogeneità tra cellule endoteliali**

Oltre alle differenze morfologiche e strutturali, tra le ECs derivanti da vasi di grosso calibro e quelle provenienti da vasi di piccolo calibro, esistono anche profonde differenze funzionali: in particolare, quest'ultime sono capaci di generare una serie di mediatori chimici, di mostrare specifici pattern di molecole di adesione, di attivare distinti set di geni, di formare capillari (12). La diversità funzionale osservata tra ECs da macro- e microcircolo si riflette in diverse caratteristiche fenotipiche. Una ben documentata differenza tra ECs provenienti da letti vascolari diversi, che si apprezza nell'ambito del processo infiammatorio, riguarda la risposta alle citochine: è stato dimostrato che colture primarie di ECs

microvascolari derivanti da pelle (19, 20), intestino (21) e cuore (22) presentano, nella risposta alle citochine, significative differenze rispetto alle HUVECs. Questo potrebbe riflettere il ruolo specializzato che tali cellule hanno a livello dei tessuti dove, diversamente dalle ECs dei grossi vasi, entrano in intimo contatto con i leucociti circolanti e in appropriate condizioni consentono la migrazione transendoteliale (23). Un altro esempio è data dall'eterogeneità di espressione degli MHC di classe II: i grandi vasi (aorta, arteria polmonare, endocardio, vena ed arteria ombelicale) non li esprimono, ma nei capillari di tutti gli organi esaminati gli MHC di classe II sono fortemente espressi (24Rose). L'eterogeneità delle ECs non si esaurisce nelle differenze tra macro- e microcircolo ma è un fenomeno più ampio: ECs provenienti da tessuti diversi manifestano una eterogeneità per quanto riguarda i markers di superficie, le proteine di trasporto e gli enzimi intracellulari (25). Un altro esempio di eterogeneità tra ECs sta nella diversa espressione dei ligandi per i recettori di homing coinvolti nel “*trafficking*” delle cellule immunitarie: Mad-CAM-1 (*Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule-1*) è primariamente espresso nelle venule ad endotelio alto delle placche di Peyer dell'intestino tenue (26), Lu-ECAM-1 (*Lung-specific EC Adhesion Molecule-1*) è espressa esclusivamente dalle ECs postcapillari polmonari e da alcune venule spleniche (27). I meccanismi alla base dell'eterogeneità tra ECs non sono pienamente chiariti ma numerose evidenze sperimentali evidenziano il ruolo cruciale del microambiente. L'esposizione locale a specifici fattori esogeni (*shear stress*, fattori solubili promuoventi o inibenti la crescita, citochine, lipidi e proteine plasmatiche), alcuni con un raggio d'azione limitato altri richiedenti un contatto cellula-cellula, sembra incidere profondamente sul fenotipo delle ECs (2). È stato osservato che ECs cresciute su estratti di membrane basali provenienti da uno specifico organo tendono a sviluppare un'adesività preferenziale proprio verso le cellule tumorali note per avere la propensione a metastatizzare quello stesso organo (28). Inoltre le possibili basi genetiche per la diversità tra ECs sono in corso di studio (2).



## **1.4 Infiammazione**

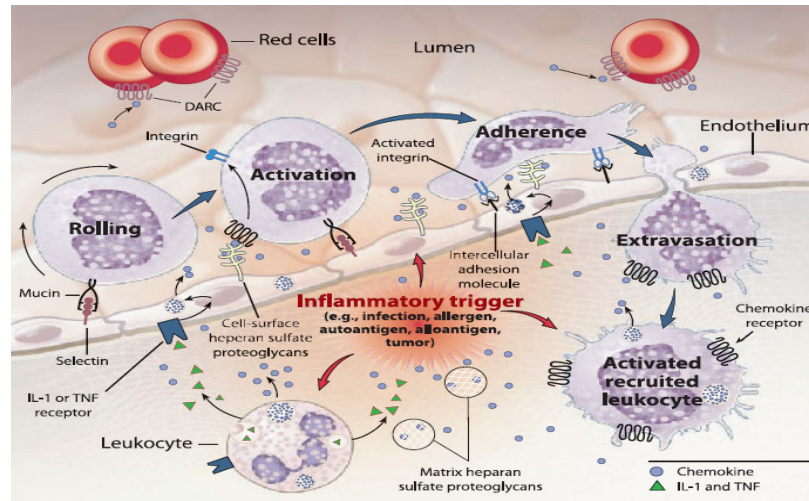
L'infiammazione è la complessa ed articolata risposta di un tessuto vascolarizzato all'azione dannosa derivante da stimoli di diversa natura, quali microorganismi patogeni (virus batteri), agenti fisici (traumi, calore) e chimici, cellule danneggiate. Si tratta di un meccanismo di difesa che si innesca a livello del tessuto vascolare prossimo alla sede del danno e che si estende localmente con lo scopo di eliminare la causa del danno, rimuovere il tessuto lesa, e promuovere i processi riparativi. L'infiammazione è una componente essenziale della risposta immunitaria innata (o naturale) e come tale ha solo limitate capacità di discriminare tra cellule sane e infettate/danneggiate: è comune quindi che anche cellule sane ma vicine al sito infiammatorio finiscano per essere danneggiate (29). Inoltre, un'infiammazione non risolta può tradursi in patologia, come ben esemplificato dall'artrite reumatoide. Il processo infiammatorio è in effetti alla base dell'insorgenza di numerose patologie (sindrome metabolica, insulino-resistenza, diabete mellito di tipo 2, aterosclerosi, malattie autoimmuni, rigetto da trapianto) alcune delle quali solo recentemente sono state riconosciute come patologie su base infiammatoria. È evidente come diventi di primaria importanza nella terapia, riuscire a controllare e a risolvere il processo infiammatorio indipendentemente dalla causa scatenante: capire come l'infiammazione si sviluppa e come è regolata è quindi un presupposto fondamentale.

## **1.5 Endotelio e immunità adattativa: interazioni ECs-leucociti**

L'infiammazione consiste in una sequenza dinamica di eventi, in cui sono coinvolti diversi tipi cellulari (cellule residenti, ECs, macrofagi, mastociti, leucociti) e diversi mediatori solubili (fattori vasoattivi come l'istamina, i leucotrieni, la prostaglandina E<sub>2</sub>, fattori chemiotattici e citochine). La prima fase di un processo infiammatorio è il riconoscimento del danno: i macrofagi tissutali, individuata la causa, si attivano e rilasciano citochine, potenti mediatori della flogosi, tra cui il TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) e l'IL-1 (Interleuchina-1).

Indotte dallo stimolo citochinico, le ECs si attivano e sintetizzano ed esprimono sulla superficie luminale molecole di adesione. Queste molecole di superficie servono ad orchestrare il “*trafficking*” delle cellule leucocitarie favorendone la migrazione verso la sede d’infiammazione. I leucociti interagiscono con la superficie vascolare attraverso un processo multistep (Fig. 3) che comprende le seguenti fasi:

1. Marginazione: il flusso sanguigno, in uscita dai capillari, spinge i leucociti verso la parete del vaso.
2. Rotolamento (*rolling*): i leucociti rotolano lungo l’endotelio aderendovi transitoriamente tramite legami deboli, spesso reversibili.
3. Attivazione e adesione (*activation, adherence*): i leucociti adesi si attivano e formano con l’endotelio legami saldi e resistenti.
4. Diapedesi ed extravasazione (*extravasation*): i leucociti si appiattiscono sulla superficie endoteliale, estroflettono gli pseudopodi con cui oltrepassano la parete vasale e, tramite chemiotassi, migrano verso la sede di infiammazione.



**Fig.3:** Interazioni endotelio-leucociti durante il processo infiammatorio. Immagine tratta da Luster *et al.* (30).

Il legame tra leucociti ed endotelio avviene solitamente a livello delle venule postcapillari dove lo *shear stress*, prodotto dall'attrito del flusso laminare sull'endotelio stesso, è minore (2). Le molecole adesive endoteliali, coinvolte nella formazione di questi legami, sono indicate collettivamente come ELAMs (*Endothelial Leukocyte Adhesion Molecules*). Il rotolamento dei leucociti sembra essere mediato principalmente da glicoproteine transmembrana appartenenti alla famiglia delle selectine (31). La L-selectina, espressa sulla superficie dei leucociti, lega ligandi di natura glicidica presenti sulla superficie di altri leucociti, o costitutivamente espressi sulle venule ad endotelio alto dei tessuti linfoidei o indotti sulle ECs dall'infiammazione; la E-selectina è espressa sia sulla superficie delle ECs attivate da citochine sia sui leucociti. I leucociti aderenti all'endotelio possono prendere contatto con altri leucociti attraverso le molecole di L-selectina, determinando così un aumento del reclutamento leucocitario verso il sito di infiammazione, con conseguente amplificazione della risposta infiammatoria (2). Le ECs, attivate da citochine, oltre a esprimere molecole adesive, secernono a loro volta citochine ad azione chemiotattica, le chemochine, che contribuiscono all'adesione leucocitaria (29). Il lento movimento di rotolamento leucocitario favorisce l'incontro con le chemochine o con lipidi autacoidi presenti nei pressi o sulla superficie apicale delle ECs: questi mediatori trasducono segnali che, in cooperazione con quelli prodotti dai legami delle selectine, attivano i leucociti, in particolare innescando il raggruppamento e l'avvicinamento (*clustering*) delle integrine verso l'area di contatto con l'endotelio (29). Le integrine leucocitarie trovano e legano saldamente sulla superficie endoteliale le ELAMs appartenenti alla famiglia delle immunoglobuline, ICAM-1 e VCAM-1. A livello dei linfonodi periferici VCAM-1 è ad esempio il ligando elettivo delle  $\alpha_4$ -integrine (32). ICAM-1 e VCAM-1, ma non le selectine, sembrano essere le molecole fondamentali per il reclutamento dei linfociti T CD8<sup>+</sup> ai siti periferici di infezione virale (33).

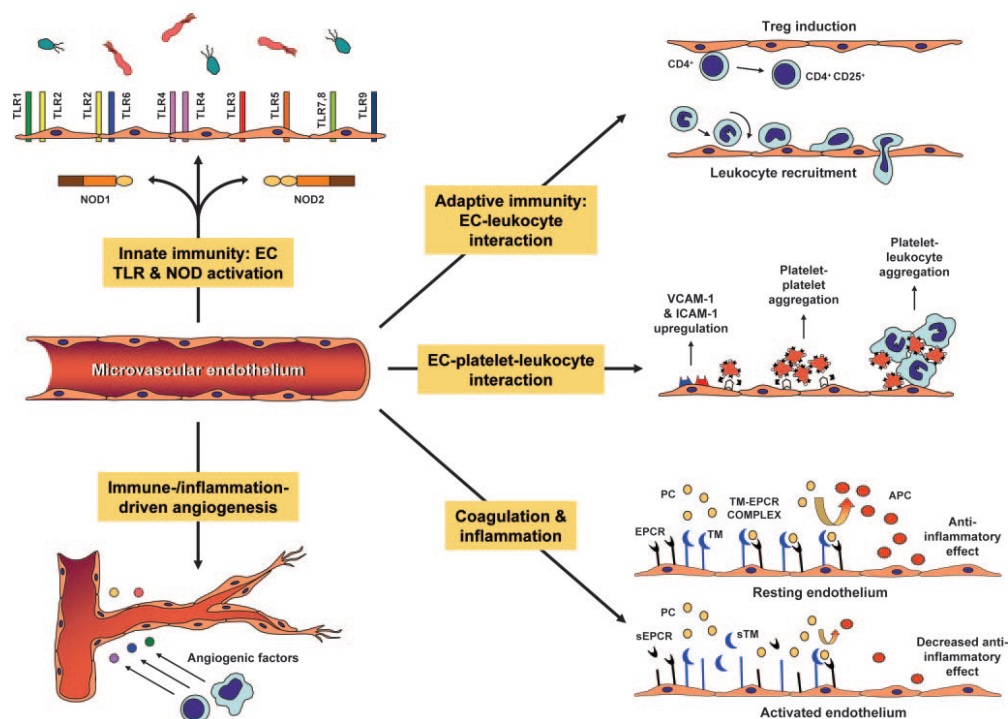
Il pattern di espressione delle ELAMs e di secrezione chemochinica è dinamico: dopo circa 2-4 ore dallo stimolo del TNF $\alpha$  si registra il picco di

espressione della E-selectina che tipicamente favorisce il reclutamento dei neutrofili; VCAM-1, più strettamente associata al reclutamento di leucociti mononucleati (linfociti e monociti/macrofagi), ha invece un picco di espressione più tardivo (circa 12-24 ore dopo lo stimolo con  $\text{TNF}\alpha$ ) che coincide infatti con l'avvio del reclutamento dei linfociti T (34). Inoltre la risposta delle ECs al  $\text{TNF}\alpha$  può essere modificata dalle citochine prodotte specificamente dai linfociti T. È stato ad esempio dimostrato che l'interferone- $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ) prolunga l'espressione della E-selectina (35) mentre il  $\text{TNF}\alpha$  ne può sopprimere l'espressione e indurre quella dell'IL-4 (36). Queste modifiche sulla superficie endoteliale determinano un corrispondente cambiamento della natura delle popolazione leucocitarie reclutate, la composizione dell'infiltrato può cioè cambiare nel tempo: si passa da un infiltrato ricco in monociti e linfociti T, caratteristico di una reazione di ipersensibilità ritardata (DTH, *Delayed Type Hypersensitivity*), ad un infiltrato ricco in linfociti T, eosinofili e basofili tipico delle reazioni tardive (LPR, *Late Phase Reactions*). Le differenze tra le risposte infiammatorie DTH e LPR sembrano essere attribuibili alla produzione locale in un caso di  $\text{IFN}\gamma$ , nell'altro di IL-4 e IL-5 (2). I linfociti T reclutati nelle reazioni DTH sono prevalentemente di tipo Th1 mentre quelli delle reazioni LPR sono di tipo Th2. Schematizzando, si può quindi dire che l' $\text{IFN}\gamma$  favorisce il reclutamento dei leucociti associati ad una risposta infiammatoria di tipo Th1 (dipendente dalla E-selectina) mentre l'IL-4 il reclutamento dei leucociti associati ad una risposta infiammatoria di tipo Th2 (indipendente dalla E-selectina) (37). Le variazioni temporali, spaziali e qualitative del pattern di espressione delle ELAMs guidano l'evoluzione e la natura della risposta infiammatoria (29). Il contributo delle ECs all'immunità adattativa potrebbe non essere semplicemente limitato alla regolata distribuzione, da esse mediata, dei leucociti dal torrente circolatorio verso la sede del danno. Pur non potendo certamente rimpiazzare le funzioni regolatorie ed effettrici dei linfociti T e B, le ECs, esprimendo o potendo essere indotte ad esprimere i complessi MHC di classe I e II, hanno la potenzialità di agire come APC (Antigen-Presenting Cell). Questa azione è stata documentata *in vitro* in modo

indiretto, ad esempio dalla formazione sulle ECs di complessi peptide-MHC funzionali che, in coltura, sono riconosciuti da linee cellulari di linfociti T (2). La questione se anche *in vivo* le ECs siano in grado di comportarsi da APC è ancora aperta e dibattuta (12).

### **1.6 Endotelio e immunità naturale**

La primaria funzione dell'immunità naturale (innata) è quella di riconoscere i PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) cioè dei motivi molecolari, strutturalmente conservati, condivisi da diversi microorganismi. I recettori predisposti al riconoscimento dei PAMPs sono indicati come PPRs (*Primitive Pattern Recognition Receptors*) e tra questi i TLRs (*Toll-Like Receptors*) giocano un ruolo cruciale nell'avvio della risposta immunitaria innata cellulo-mediata. Dai TLRs partono vie segnalatorie che esitano nella chemiotassi leucocitaria, nella fagocitosi, nella citotossicità, nell'espressione di geni coinvolti nell'infiammazione, e infine nell'attivazione della risposta immunitaria di tipo adattativo. È stato dimostrato che anche le ECs hanno sulla loro superficie diversi tipi di TLRs (38) (Fig. 4). Il TLR2 è stato identificato sull'endotelio aterosclerotico e si è dimostrato marcatamente espresso durante l'infiammazione vascolare (39). È stato osservato che le ECs delle coronarie umane sono iporesponsive ai ligandi specifici per TLR2 (40): dal momento che i TLR2 sono ritenuti pro-aterogeni la soppressione dell'espressione dei TLR2 indotta dal flusso sanguigno può avere un significato atero-protettivo. Anche l'espressione del TLR4 risulta significativamente aumentata in condizioni infiammatorie: TLR4 è over-espresso in ECs coronariche dove è stato dimostrato colocalizzare con la subunità p65 di NF- $\kappa$ B a livello delle placche aterosclerotiche (39). Quest'ultima osservazione ha suggerito una possibile attivazione del TLR4 a livello della placca aterosclerotica.



**Fig.4:** Panoramica sulle funzioni e sulle interazioni cellulari mediate dalle ECs microvascolari che influenzano la risposta immunitaria innata e adattativa, la coagulazione e l'infiammazione. PC, protein C; APC, activated protein C; EPCR endothelial protein C receptor; sEPCR, soluble EPCR; TM, trombomodulina; sTM, soluble TM. Immagine tratta da Danese *et al.*, (12).

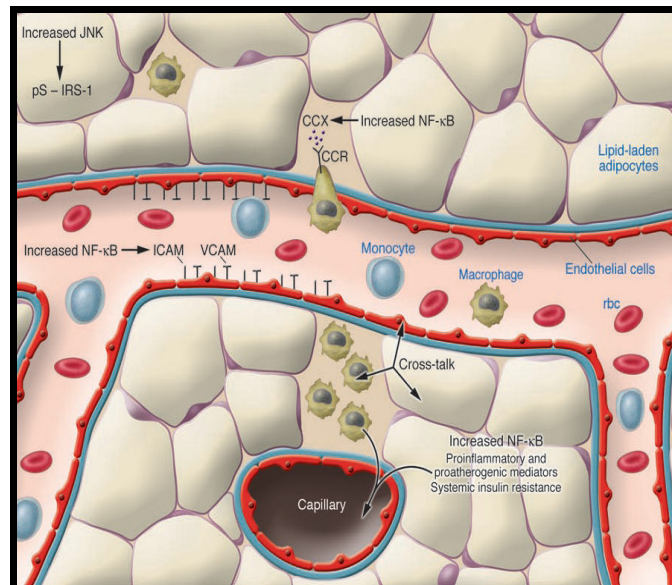
### 1.7 Ruolo di endotelio e infiammazione nell'insorgenza di malattie vascolari e disfunzioni immunitarie: implicazioni terapeutiche

Un'alterata funzione endoteliale è alla base di numerose patologie vascolari e disfunzioni immunitarie. Nell'artrite reumatoide (AR), le ECs sinoviali sono attivate, esprimono molecole di adesione, secernono chemochine e mostrano un'incrementata permeabilità, apoptosi e angiogenesi (41), cambiamenti che contribuiscono al reclutamento dei leucociti, all'edema e al progressivo deterioramento della giunzione articolare (42). Nella sclerosi multipla la migrazione transendoteliale di leucociti attivati è una delle più precoci alterazioni: l'esposizione delle ECs all'IFN $\gamma$ , al TNF $\alpha$  e all'IL-1 $\beta$ , prodotti dalle cellule immunitarie, danneggia la barriera emato-encefalica determinando una disorganizzazione delle giunzioni cellula-cellula, promuovendo l'adesione e la

migrazione leucocitaria e aumentando l'espressione dell'MHC di classe II (43). Progressi nella biologia vascolare hanno fatto emergere il ruolo patogenico dei vasi del microcircolo nell'inizio e nella progressione delle malattie infiammatorie croniche dell'intestino o IBD (*Inflammatory Bowel Disease*). Le alterazioni alla base della patogenesi delle IBD non sono ascrivibili solo alle cellule immunitarie: infatti, durante l'infiammazione, il microcircolo della mucosa intestinale controlla la natura e l'entità dell'influsso leucocitario dallo spazio intravascolare a quello interstiziale, attraverso l'espressione di molecole di adesione e la secrezione chemochinica (44). Nell'endotelio di pazienti affetti da IBD, oltre ad un aumento delle molecole di adesione classiche, è stato osservato un aumento della fractalkina una chemochina unica che combina le proprietà di chemochina a quelle di molecola di adesione (45). HIMECs (*Human Intestinal Microvascular ECs*) isolate da pazienti affetti da IBD mostrano, a seguito dello stimolo con IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ , un aumento d'espressione della fractalkina rispetto alle HIMECs derivanti da soggetti di controllo.

Numerose sono inoltre le evidenze sperimentali che hanno messo in relazione un'infiammazione cronica sistemica con specifiche condizioni metaboliche quali obesità, insulino-resistenza (IR), diabete mellito di tipo 2 (T2DM): la dimostrazione che la citochina pro-infiammatoria TNF $\alpha$ , prodotta dagli adipociti, è in grado di indurre insulino-resistenza in modelli sperimentali (46, 47) è stata la prima prova di un legame tra infiammazione e stato metabolico disfunzionale. Il tessuto adiposo si è rivelato un organo endocrino capace di produrre una serie di citochine (adipochine) e sostanze bioattive con azione locale e con potenziale effetto sistemico. È stato osservato che l'aumento della massa adiposa correla positivamente con l'aumento nella produzione di adipochine pro-infiammatorie (TNF $\alpha$ , IL-6, MCP-1, IL-1, resistina). In particolare l'MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein-1*) è implicato nel reclutamento dei macrofagi nel tessuto adiposo e TNF $\alpha$ , IL-6 e resistina sembrano partecipare all'induzione e al mantenimento dello stato infiammatorio subacuto associato all'obesità (48). Il tessuto adiposo è un organo altamente vascolarizzato con capillari in contatto con

ciascun adipocita, e l'endotelio non può che contribuire all'infiammazione del tessuto adiposo stesso: i leucociti circolanti non aderiscono ad un endotelio normale ma, dopo una dieta ad alto contenuto di grassi, l'endotelio esprime molecole di adesione (selectine, VCAM-1, ICAM-1) che legano i leucociti (48) e favoriscono, in collaborazione con l'MPC-1, l'infiltrazione macrofagica. Il tessuto adiposo di individui obesi è caratterizzato da una consistente presenza di macrofagi che rappresentano un'ulteriore fonte di citochine pro-infiammatorie (49) (Fig. 5). Le cellule infiltranti il tessuto adiposo, macrofagi e linfociti T, creano un milieu citochinico che perpetua lo stato infiammatorio del tessuto e stimola ulteriormente gli adipociti a produrre quei mediatori infiammatori che contribuiscono a reclutare nuove cellule infiammatorie: si instaura così un circolo vizioso autoalimentante responsabile dello stato infiammatorio cronico che accompagna l'obesità (49).



**Fig.5:** Rappresentazione delle complesse relazioni che si instaurano a livello del tessuto adiposo tra adipociti, ECs e leucociti. Immagine tratta da Tilg *et al.* (49).

Un processo infiammatorio, per molti aspetti analogo a quello descritto per il tessuto adiposo, si rileva anche nello sviluppo del processo aterosclerotico ed ha suggerito che l'infiammazione possa essere il comun denominatore che lega



l'obesità a molte delle patologie ad essa associate (IR, T2DM, malattie cardiovascolari). Nonostante la sua natura multifattoriale, un grande impulso per comprendere la patogenesi dell'aterosclerosi è derivato dal riconoscere nell'infiammazione la forza unificante e trainante che ne media tutte le fasi, dall'inizio alla progressione e alle eventuali complicanze. L'evento critico, responsabile dell'inizio del processo aterosclerotico, consiste nella perdita dell'integrità dell'endotelio e delle sue funzioni che consente l'infiltrazione di lipidi e dei monociti circolanti che invadono la parete dell'arteria diventando macrofagi residenti (*foam cells*). Segni di infiammazione sono presenti già nelle prime fasi di deposito di lipidi nella parete arteriosa; le ECs manifestano i primi segni di disfunzione/attivazione incrementando le proprietà adesive. È stato osservato che VCAM-1 lega in particolar modo quelle classi di leucociti che si ritrovano nell'ateroma nascente, i monociti ed i linfociti T, e che, a seguito di un'alimentazione ricca in colesterolo, le ECs esprimono selettivamente VCAM-1 nelle aree più predisposte a sviluppare le lesioni aterosclerotiche(50). Il meccanismo con cui VCAM-1 è rapidamente indotto da una dieta aterogena dipende probabilmente dall'infiammazione innescata dalle particelle lipoproteiche modificate (LDL-ossidate) che si accumulano a livello dell'intima in seguito ad una condizione di iperlipidemia. La conseguente alterazione dello stato ossidativo delle ECs è accompagnato da un incremento delle loro capacità adesive, in quanto i radicali dell'ossigeno possono funzionare da mediatori endocellulari capaci di mediare l'incremento dell'attività del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B. L'aumento dell'attività di NF- $\kappa$ B, mediata anche dalle citochine pro-infiammatorie TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , induce a sua volta un coordinato fenomeno di *up-regulation* di recettori di adesione come VCAM-1 e chemochine come MCP-1 (51).

Un'osservazione molto interessante, che mette in luce quanto malattie apparentemente molto diverse possono essere accomunate da meccanismi di insorgenza simili, deriva dal fatto che l'artrite reumatoide è associata ad un aumentato rischio di patologie cardiovascolari (CVD, *Cardiovascular disease*).

Tra le manifestazioni extra-articolari dell'AR, il coinvolgimento dell'apparato cardiovascolare ed in particolare la cardiopatia ischemica (*Coronary Artery Disease*, CAD) rappresenta, per la sua severità prognostica, una delle più frequenti cause di morte (52). Numerose sono le evidenze sperimentali che rilevano come la distruttiva cascata di mediatori pro-infiammatori ed i meccanismi effettori implicati nella AR assomiglino a quelli che guidano lo sviluppo dell'aterosclerosi. IL-1, IL-6 e  $TNF\alpha$  prodotti localmente a livello articolare possono promuovere i fattori di rischio cardiovascolare sistemici tradizionali (ad esempio la dislipidemia e l'IR) e non tradizionali (ad esempio lo stress ossidativo) (52).

Da quanto illustrato sopra risulta evidente come le ECs siano profondamente coinvolte nel determinare se le cellule immunitarie funzioneranno nei limiti dell'omeostasi o se la loro azione sfocerà in fenomeni di autoimmunità o di disordini infiammatori cronici. Vista l'importanza del ruolo delle ECs, appare chiaro come esse possano diventare un potenziale *target* terapeutico quando si voglia ristabilire una normale immunità e risolvere l'infiammazione. È immaginabile che un pieno e permanente recupero dell'omeostasi immunitaria, in particolare nelle condizioni di infiammazione cronica, sia conseguibile solo attraverso un approccio duplice, che miri non solo ad un'immunosoppressione ma anche ad un recupero della normale funzionalità endoteliale (12).

### ***1.8 Citochine infiammatorie : $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$***

La fase effettrice dei meccanismi aspecifici di difesa e dell'immunità mediata dai linfociti T è in gran parte diretta da proteine denominate citochine, prodotte soprattutto dai linfociti T e dai macrofagi. Le citochine costituiscono il linguaggio molecolare per la comunicazione tra le diverse cellule del sistema immunitario e tra queste ed altre cellule. Le citochine differiscono dalle classiche molecole ormonali in quanto non sono prodotte da tipi cellulari specializzati che riversano nel circolo sanguigno il loro secreto (modalità endocrina); le citochine possono

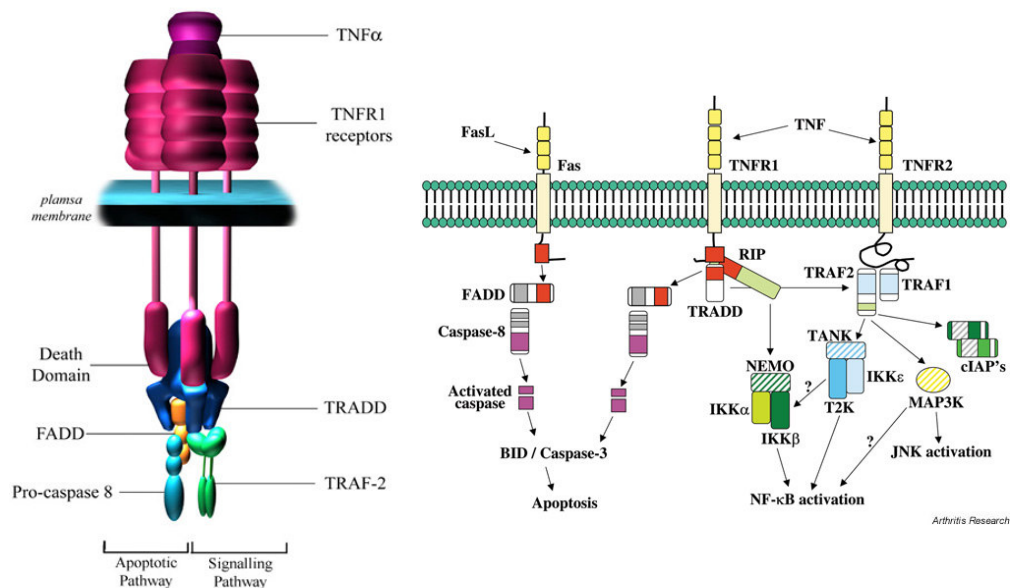
infatti essere secrete da tipi cellulari diversi ed in genere hanno un breve raggio di azione, agendo prevalentemente con una modalità paracrina o autocrina.

Il  $\text{TNF}\alpha$  e l' $\text{IFN}\gamma$  sono le principali citochine che, durante una risposta infiammatoria vascolare di tipo Th1, coordinano l'interazione tra cellule residenti un tessuto ed i linfociti e macrofagi infiltranti. L' $\text{IFN}\gamma$ , secreto dai linfociti T attivati, rappresenta la principale citochina di tipo Th1 mentre il  $\text{TNF}\alpha$ , secreto da monociti/macrofagi e cellule residenti, è considerato una citochina ad azione pleiotropica, coinvolta in una generica risposta infiammatoria.

### ***1.9 $\text{TNF}\alpha$ e vie di trasduzione del segnale***

Il  $\text{TNF}\alpha$  è una citochina omo-trimerica molto potente, prodotta da svariati tipi cellulari, principalmente dai macrofagi attivati ma anche da linfociti, fibroblasti, cheratinociti. Il  $\text{TNF}\alpha$  media un ampio spettro di risposte cellulari essendo coinvolto nell'immunità, nell'infiammazione, nel controllo della proliferazione, del differenziamento e dell'apoptosi. Il ruolo centrale di questa citochina nell'infiammazione è emerso dall'osservazione che topi *knockout* per il  $\text{TNF}\alpha$  o per il suo recettore hanno una risposta infiammatoria compromessa (53) e che, nell'uomo, gli inibitori del  $\text{TNF}\alpha$  (sottoforma di recettori solubili o anticorpi neutralizzanti) hanno un effetto terapeutico anti-infiammatorio (54). L'esposizione cellulare al  $\text{TNF}\alpha$  può portare all'attivazione della cascata caspatica e all'apoptosi. Comunque, più comunemente, il legame del  $\text{TNF}\alpha$  al suo recettore causa l'attivazione di due importanti fattori trascrizionali, AP-1 e  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , che a loro volta inducono la trascrizione di geni coinvolti nella risposta infiammatoria acuta e cronica (55, 56). Il  $\text{TNF}\alpha$  esercita i suoi effetti attraverso due distinti recettori di membrana il  $\text{TNF-R1}$  e il  $\text{TNF-R2}$ . Il legame della citochina al dominio extracellulare determina la trimerizzazione del recettore e il rilascio di una proteina inibitoria, SODD (*Silencer Of Death Domains*), dal dominio DD (*Death Domains*) intracellulare del  $\text{TNF-R1}$ . La prima proteina reclutata dal  $\text{TNF-R1}$ , tramite interazione tra le regioni omologhe DD, è TRADD

(TNF-R1-Associated Death Domain) che funziona come piattaforma per il reclutamento di almeno altre tre proteine adattatrici, RIP1 (*Receptor-Interacting Protein-1*) FADD (Fas-Associated Death Domain) e TRAF2 (TNF-R-Associated Factor 2) (57). Il legame del TNF $\alpha$  al TNF-R2 comporta un reclutamento diretto di TRAF2 che a sua volta recluta TRAF1. TRAF2 gioca un ruolo cruciale negli eventi (comuni a entrambi i recettori del TNF $\alpha$ ) che portano all'attivazione di IKK (IkB Kinase) e di proteine della famiglia di MAPK (*Mitogen Activated Protein-Kinase*) (Fig. 6). L'over-espressione di RIP o di TRAF2 è sufficiente ad attivare, indipendentemente da TNF $\alpha$ , TNF-R1 e TRADD, le vie di segnalazione che portano all'attivazione dei fattori trascrizionali AP-1 e NF- $\kappa$ B probabilmente portando all'associazione di proteine adattatrici con modalità non fisiologica (29). I *target* diretti a valle di RIP e TRAF2 non sono ancora stati ben identificati ma è noto che le vie di segnalazione di NF- $\kappa$ B e di AP-1 sono attivate da membri della famiglia delle MAPK chinasi chinasi (MEKK).

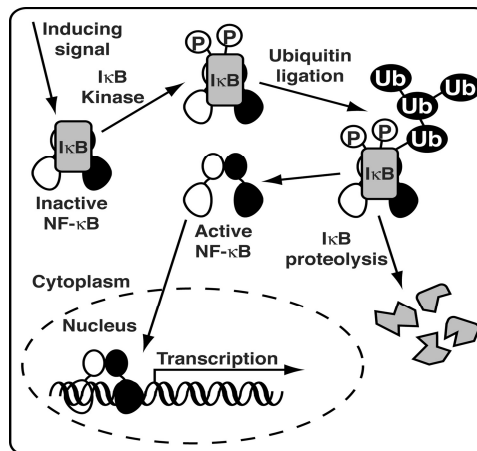


**Fig.6:** Schematica rappresentazione del recettore di tipo 1 per il TNF $\alpha$  (TNF-R1) (a sinistra) e delle diverse vie di trasduzione del segnale attivate dal TNF $\alpha$  mediante i recettori TNF-R1 e TNF-R2 (a destra).

### 1.9.1 Attivazione di NF- $\kappa$ B

Diverse MEKKs possono attivare per fosforilazione un complesso enzimatico citosolico detto IKK (I $\kappa$ B Kinase) costituito da almeno due proteine ad attività chinasi, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , ed una regolatrice detta NEMO (29).

Normalmente, in cellule non sottoposte a stimoli, I $\kappa$ B sequestra nel citosol il complesso dimerico di NF- $\kappa$ B impedendone la traslocazione nucleare e, conseguentemente, la trascrizione genica. In risposta al TNF $\alpha$ , I $\kappa$ B è fosforilato dal complesso IKK su residui di serina ed è rapidamente ubiquitinato e poi degradato nel proteasoma (58, 59) (Fig. 7). È stato osservato che nelle HUVECs questo processo avviene molto rapidamente, entro 15' dallo stimolo con TNF $\alpha$ .



**Fig.7:** Rappresentazione schematica del meccanismo di regolazione dell'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B.

Una volta che I $\kappa$ B è stato degradato NF- $\kappa$ B è libero di traslocare nel nucleo e di attivare la trascrizione genica andando a legarsi a specifiche sequenze di DNA nelle regioni enhancer dei geni *target* (29). Il promotore del gene per il TNF $\alpha$  contiene le sequenze di legame per NF- $\kappa$ B e AP-1 ed è quindi soggetto ad una autoregolazione di tipo positivo, una proprietà importante che garantisce l'amplificazione della risposta infiammatoria (57).

Una volta nel nucleo, l'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B può essere modulata tramite fosforilazione da parte di quelle proteine chinasi che a loro volta sono responsive al TNF $\alpha$ , ad esempio dalla p38 appartenente alle MAPKs: questo rappresenta quindi un punto di *crosstalk* con vie di segnalazione diverse (57).

Nelle HUVEC, NF- $\kappa$ B, attivato dal TNF $\alpha$ , può essere presente sottoforma di omodimero o eterodimero che possono essere costituiti da tre proteine appartenenti alla famiglia di Rel, nello specifico da p50, p65 (o Rel A) e da c-Rel (29). Tramite saggi EMSA (*Electrophoretic-Mobility-Shift Assay*), è stato evidenziato come regioni del promotore della E-selectina o di VCAM-1 leghino preferenzialmente l'eterodimero p50/p65 (60, 61). Il promotore di ICAM-1, al contrario, contiene una regione che lega preferenzialmente gli eterodimeri p50/c-Rel (62).

### **1.9.2 Attivazione di AP-1**

L'attivazione di AP-1 avviene quando una chinasi appartenente alla famiglia delle MEKK (probabilmente MEKK-1) fosforila chinasi appartenenti alla famiglia delle MEKs (MAPK *Kinase*) che a loro volta fosforilano e attivano diverse MAPK quali JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) e p38 MAPK (63). JNK fosforila il dominio di transattivazione di c-Jun, un componente del fattore trascrizionale AP-1 che viene così attivato. La funzione più tipica di JNK e p38 è quella di attivare, in modo TNF $\alpha$  dipendente, AP-1 che a sua volta contribuisce all'induzione dei geni *target* del TNF $\alpha$ . Sia ICAM-1 che VCAM-1 contengono, a livello del loro promotore, siti di legame per AP-1 (comunemente chiamati TREs, *Tetrahydrophobol Response Elements*): in ECs trattate con TNF $\alpha$ , AP-1 attivato lega le sequenze TREs attivando la trascrizione delle due molecole di adesione (29).

### **1.10 TNF-R1 e TNF-R2**

Il TNF $\alpha$  può interagire con due distinti recettori di membrana il TNF-R1 (noto anche come CD120a o p55) e il TNF-R2 (CD120b o p75) la cui espressione varia a seconda del tipo cellulare (64). Il ruolo di ciascun recettore nel mediare le diverse funzioni del TNF $\alpha$  non è ad oggi del tutto chiarito. È stato dimostrato, con approcci sperimentali diversi (analisi FACS, immuno-precipitazione, immunofluorescenza indiretta), che le HUVEC esprimono entrambi i recettori. Il TNF-R2 è maggiormente espresso sulla superficie di membrana rispetto al TNF-R1, è sottoposto ad endocitosi ed è trasportato ai lisosomi tramite vescicole rivestite (65); il TNF-R1 è molto meno espresso al plasmalemma ma è complessivamente più abbondante, si ritrova infatti prevalentemente a livello dell'apparato del Golgi e in minor misura in vacuoli citoplasmatici (65). Quando il TNF $\alpha$  si lega alle ECs viene in gran parte internalizzato rapidamente e sembra che questo sia in gran parte mediato dal TNFR-2. È stato dimostrato che entrambi i recettori possono contribuire all'attivazione delle ECs ma che comunque il *signaling* attraverso il TNF-R1 sembra essere sufficiente per attivare completamente le ECs (64). D'altra parte il TNF-R2, pur non innescando una propria via di *signaling*, sembrerebbe incrementare la sensibilità delle cellule al TNF $\alpha$  in accordo l'ipotesi di Tartaglia *et al.*: attraverso una rapida associazione e dissociazione del ligando, il TNF-R2, a maggior affinità, potrebbe regolare l'associazione del TNF $\alpha$  al TNF-R1, a minor affinità, incrementando la concentrazione locale di TNF $\alpha$  alla superficie cellulare (66). Nonostante il TNF-R1 sia stato a lungo considerato il mediatore predominante del *signaling* del TNF $\alpha$ , e al TNF-R2 siano state ascritte solo funzioni ausiliari, sono sempre più numerose le evidenze cliniche e sperimentali che attribuiscono al TNF-R1 un ruolo indipendente, in particolare nel *signaling* che media gli stati di infiammazione cronica(67).

### ***1.11 IFN $\gamma$ ed attivazione macrofagica***

Gli interferoni (IFNs), citochine secrete da diversi tipi cellulari in risposta a molteplici stimoli, sono stati originariamente scoperti per la loro attività antivirale. La famiglia degli interferoni può essere suddivisa in 2 classi in base al tipo di recettore che ne media il segnale: gli interferoni di tipo I e gli interferoni di tipo II. L'IFN $\gamma$  è l'unico appartenente alla classe di tipo II, è strutturalmente diverso dagli altri IFNs ed è codificato da un locus cromosomico ben distinto (68).

Durante una risposta immunitaria innata o adattativa, i macrofagi rispondono a svariati mediatori cellulari, ma tra questi l'IFN $\gamma$  è tra i più importanti. L'attivazione dei macrofagi da parte dell'IFN $\gamma$  può essere definita come "acquisizione della competenza ad eseguire funzioni complesse" ed è una delle prime risposte dell'immunità innata contro un patogeno. La stimolazione dei macrofagi con IFN $\gamma$  attiva meccanismi antimicrobici e antitumorali, determina una "*up-regulation*" della via di processamento e presentazione dell'antigene (tramite aumento degli MHC di classe I e II), dirige la crescita, la maturazione e il differenziamento di numerosi tipi cellulari oltre ad aumentare l'attività delle cellule NK e a regolare le funzioni dei linfociti B. Inizialmente si riteneva che solo i linfociti *helper* CD4<sup>+</sup> (Th1), i linfociti citotossici CD8<sup>+</sup> e le cellule NK (*Natural Killer*) producessero IFN $\gamma$  ma è ormai accertato che anche le cellule APC (monociti/macrofagi, cellule dendritiche) sono in grado di produrlo (69). La produzione di IFN $\gamma$  da parte delle APCs, agendo localmente, potrebbe avere un significato di auto-attivazione e di attivazione di cellule limitrofe, importante nella risposta immunitaria precoce, mentre nella risposta immunitaria adattativa sono i linfociti T a diventare la principale fonte di IFN $\gamma$  (70).



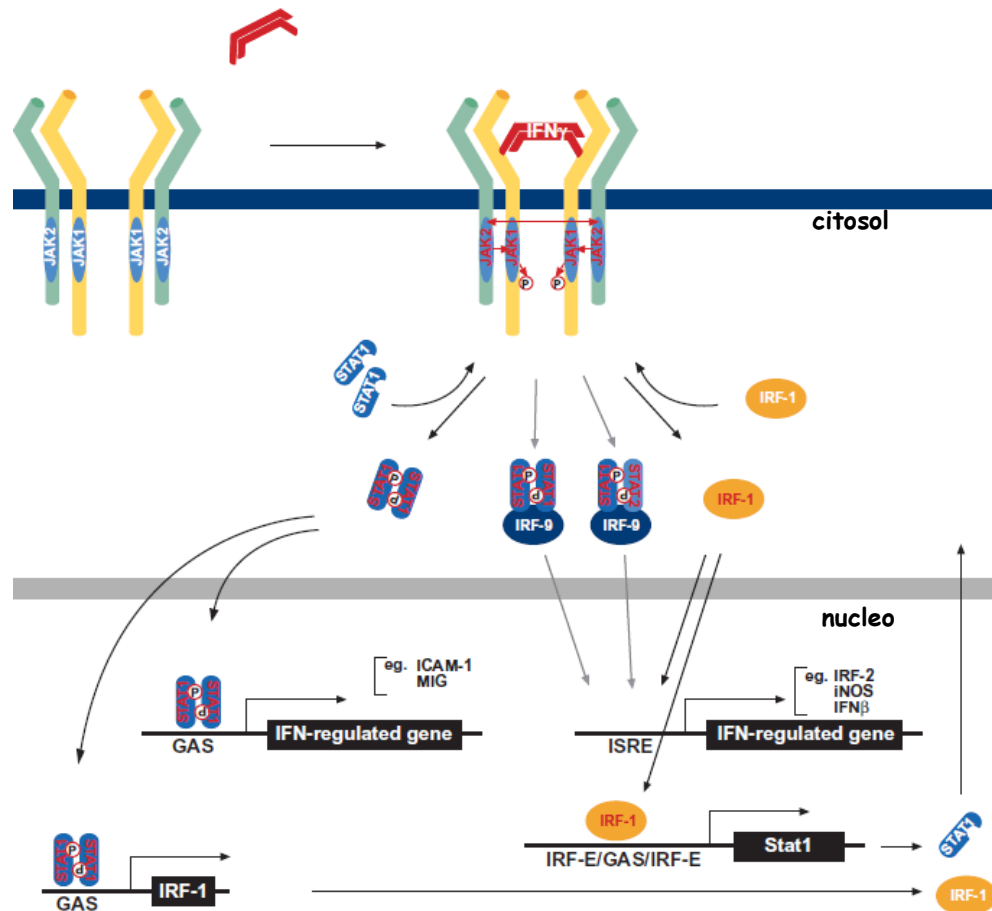
### ***1.11.1 IFNR e meccanismo di trasduzione del segnale (“Jak-STAT pathway”)***

L'IFN $\gamma$  attiva principalmente la via di segnalazione nota come “Jak-STAT pathway” in cui si attua un sequenziale reclutamento al recettore ed un'attivazione dei membri della famiglia delle proteine tirosino-chinasi Jak (*Janus tyrosine kinase*) e delle proteine STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*): l'evento finale è la modulazione della trascrizione genica che avviene attraverso il legame dei fattori trascrizionali STAT a specifici elementi di risposta a livello del promotore dei geni *target*.

Il recettore per l'IFN $\gamma$  (IFNR) è costituito da due catene IFNR1 per il legame con il ligando associate a due catene IFNR2 che trasducono il segnale. Nessuno dei due tipi di catene possiede un'attività enzimatica (chinasica o fosfatasica) e quindi, perché la trasduzione del segnale avvenga, il recettore deve reclutare altre proteine. Il dominio intracellulare di IFNR1 contiene dei motivi strutturali che legano rispettivamente le proteine chinasi Jak1 e le proteine STAT-1. Affinché STAT-1 possa essere reclutato al recettore occorre che, durante la trasduzione del segnale, sia fosforilato un residuo di tirosina di ciascuna catena IFNR1. Questi residui fosforilati funzionano come siti di ancoraggio per le proteine STAT. La regione intracellulare di IFNR2 contiene un motivo strutturale di legame per la chinasi Jak2 la quale partecipa alla trasduzione del segnale (69). Esperimenti di cross-linking con IFN $\gamma$  marcato hanno dimostrato che l'IFN $\gamma$  si associa con la catena IFNR2 solo quando è presente anche IFNR1 indicando che l'interazione tra IFNR2 e il complesso IFN $\gamma$ -IFNR1 si instaura tra le catene 1 e 2 del recettore e non con il ligando (71).

Inizialmente si riteneva che, in assenza di ligando, le catene IFNR1 e IFNR2 non fossero strettamente associate ma nuove tecniche sperimentali hanno permesso di dimostrare che il complesso recettoriale è già assemblato prima del legame con il ligando (72). La forma biologicamente attiva dell'IFN $\gamma$  è un omodimero non covalente formato dall'auto-associazione di due catene polipeptidiche ad orientamento antiparallelo. A seguito del legame con l'IFN $\gamma$

(con stechiometria di legame 2:2), il cambiamento conformazionale del recettore induce l'attivazione delle chinasi Jak2 che si auto-fosforilano vicendevolmente e poi trans-fosforilano e attivano le chinasi Jak1. Quest'ultime fosforilano, su ciascuna catena IFNR1, il residuo di tirosina fondamentale per il legame con i domini SH2 (Src Homology 2) di STAT-1. Una volta reclutata al recettore tramite i domini SH2, la coppia di proteine STAT-1 viene fosforilata; a seguito della fosforilazione, l'omodimero STAT-1 si dissocia dal recettore, trasloca nel nucleo e, legandosi a specifici elementi di risposta (GAS, *interferon- $\gamma$ -Activation Site*) a livello del promotore dei geni IFN $\gamma$ -regolati, attiva o inibisce la trascrizione genica (69) (Fig. 8).



**Fig.8:** Via di trasduzione del segnale dell'IFN $\gamma$ . Immagine tratta da Schroder *et al.* (69).

È stato osservato che l'ingresso di STAT-1 nel nucleo avviene dopo circa 15' dallo stimolo con IFN $\gamma$ , ed è quasi completo dopo circa 30' (73). La via di segnalazione dell'IFN $\gamma$  non porta solo alla formazione di omodimeri di STAT-1 ma, in misura minore, anche di altri complessi attivi quali eterodimeri di STAT-1 (ad esempio STAT-1-STAT-2), ed eterotrimeri con IRF-9 (*IFN Regulatory Factor-9*). Molti dei geni regolati dall'IFN $\gamma$  sono fattori trascrizionali (ad esempio IRF-1) capaci di regolare una seconda ondata di trascrizione, successiva cioè a quella indotta direttamente dall'IFN $\gamma$ . Gli eterotrimeri STAT-1-STAT-1-IRF9 e IRF1 sono in grado di legare le sequenze ISRE (*IFN-Stimulated Response Element*) nei promotori di nuovi geni *target* per regolarne la trascrizione (69).

### ***1.11.2 I fattori trascrizionali STAT***

Le proteine STAT sono un gruppo di fattori trascrizionali citoplasmatici di cui si conoscono sette membri, STAT-1, 2, 3, 4, 5a, 5b, 6 che condividono una comune struttura a domini. Il dominio amino-terminale è coinvolto nello stabilizzare le interazioni tra dimeri di STAT e favorire così la formazione di tetrameri a livello di sequenze GAS ed elementi ISGF3 (*IFN-stimulated genes factor 3*) allineati in tandem. Il dominio centrale legante il DNA contiene diversi residui conservati in tutti i membri della famiglia di STAT. Un dominio linker separa il dominio legante il DNA da quello SH2 fondamentale per il legame al recettore e per la dimerizzazione. All'interno del dominio SH2 è infatti presente un residuo di tirosina conservato che quando viene fosforilato permette l'interazione con il dominio SH2 di un altro STAT. All'estremità carbossi-terminale è presente il dominio di transattivazione trascrizionale che modula la funzione trascrizionale della proteina.

### ***1.12 Sviluppo della risposta infiammatoria di tipo Th1***

Negli ultimi anni è stato possibile dimostrare e delineare meglio il ruolo che la risposta immunitaria ha nella patogenesi di numerose malattie. In particolare, lo

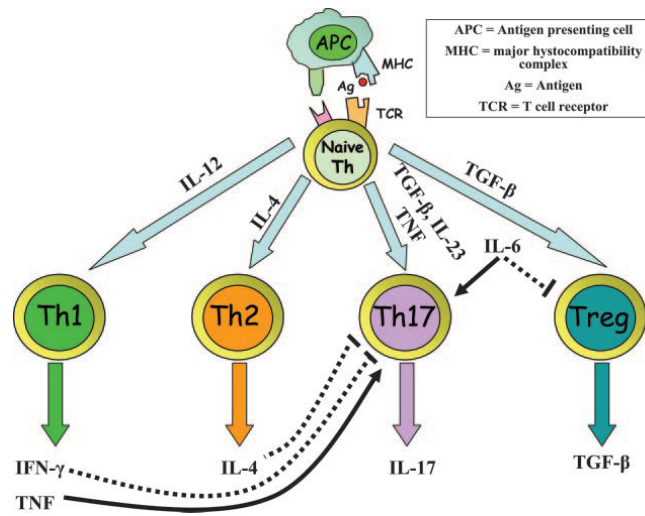
studio dei complessi meccanismi alla base della risposta infiammatoria definita “di tipo Th1” è volto ad individuare, per il trattamento delle patologie su base Th1, nuove strategie terapeutiche che siano di appoggio all’approccio attuale, basato principalmente su una generica immunosoppressione a cui sono connessi pesanti effetti collaterali. Lo sviluppo di una popolazione di linfociti Th1 è il risultato di un complesso processo differenziativo, finemente modulato dall’azione di diverse citochine tra cui lo stesso IFN $\gamma$ , citochina prototipica dei Th1.

### ***1.13 Differenziamento dei linfociti Th***

I linfociti T, protagonisti dell’immunità adattativa cellulo-mediata, sono stati originariamente suddivisi in due popolazioni principali, i linfociti T *helper* CD4<sup>+</sup> (Th) ed i linfociti T citotossici CD8<sup>+</sup> (Tc). Successivamente, a seguito del brillante lavoro di Mosmann e Coffman (74), sono state identificate due diverse sottopopolazioni di linfociti Th CD4<sup>+</sup>, con distinte capacità effettrici e distinto pannello di secrezione citochinica, quella dei linfociti Th1 e dei Th2. I linfociti Th1 si caratterizzano per la secrezione di IL-2, TNF $\beta$  ma soprattutto di IFN $\gamma$  che promuove l’attivazione dei macrofagi e induce fenomeni di citotossicità; i Th2 sono stati considerati avere un ruolo di tipo regolatorio in quanto le citochine da essi prodotte (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) sono coinvolte sia nello stimolo dell’immunità umorale (attivazione dei linfociti B e switch isotipico) sia nell’inibizione della produzione di citochine Th1 (75). Secondo il cosiddetto paradigma Th1/Th2, i linfociti Th1 erano i responsabili delle risposte pro-infiammatorie, come la reazione di ipersensibilità ritardata (DTH, *Delayed Type Hypersensitivity*), e guidavano la risposta verso microorganismi intracellulari, mentre i Th2 dirigevano la risposta contro molti patogeni extracellulari quali gli elminti. Sempre in questa ottica un’abnorme attivazione dei Th1 era considerata l’evento critico nella maggior parte delle malattie autoimmuni mentre i Th2 erano i responsabili delle malattie allergiche e dell’asma. La recente scoperta di nuove sottopopolazione di linfociti, i Treg (T *regulatory*) ed i Th17, ha modificato in

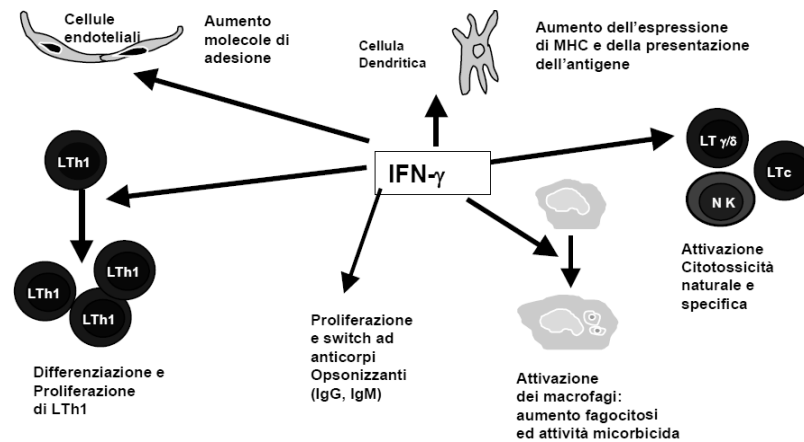
parte questa visione dicotomica. In particolare è stato osservato che, in modelli animali di malattie autoimmuni (ad esempio l'encefalomielite autoimmune sperimentale, modello della sclerosi multipla, e l'artrite indotta da collagene, modello dell'artrite reumatoide), alcune delle risposte autoimmuni formalmente attribuite ai Th1 sarebbero, almeno in parte, modulate dai Th17 (76). Nel campo delle malattie immuno-mediate, la scoperta dei Th17 ha permesso di dare delle risposte a quelle discrepanze paradossali e di difficile comprensione, risultanti dal paradigma Th1/Th2. Comunque, occorre sottolineare che, nonostante le numerose pubblicazioni sul coinvolgimento dei Th17 nell'autoimmunità, molte delle evidenze sperimentali sul coinvolgimento dei Th1 nelle malattie autoimmuni restano tuttora valide (77).

Il destino differenziativo di un linfocita Th naive è determinato dall'insieme di segnali che riceve durante il primo incontro con l'antigene (*priming*) ed è profondamente influenzato dal milieu citochinico (Fig. 9). Ad esempio, la produzione, da parte della APC attivate, di IL-12 promuove il differenziamento della sottopopolazione Th1 attraverso l'attivazione, nel linfocita T, di fattori trascrizionali quali STAT-4, STAT-1 e T-bet. Per il differenziamento della sottopopolazione Th2 è invece essenziale la presenza di IL-4 che attivando STAT-6 promuove l'espressione del fattore trascrizionale caratterizzante la sottopopolazione, GATA-3.



**Fig.9:** Rappresentazione schematica delle possibili vie di differenziamento dei linfociti Th. Immagine tratta da Rotondi *et al.* (78).

L'IFN $\gamma$  è la principale citochina secreta dai linfociti Th1 ed è caratterizzata da un meccanismo a *feedback* positivo che contribuisce a sostenere la polarizzazione verso il fenotipo Th1. La capacità dell'IFN $\gamma$  di coordinare la transizione da un'immunità innata a quella adattativa lo contraddistingue dagli altri IFNs. I meccanismi con cui l'IFN $\gamma$  coordina questa transizione includono sia il suo contributo allo sviluppo del fenotipo Th1 (con meccanismo a *feedback* positivo assieme all'azione dell'IL-12), sia la regolazione delle interazioni leucociti-endotelio (69). L'IFN $\gamma$  orchestra il “*trafficking*” di specifici leucociti verso i siti d'infiammazione: questo è reso possibile attraverso le specifiche azioni che esso esercita su tipi cellulari diversi (ECs, macrofagi, cellule residenti un tessuto od organo) (Fig. 10) nei quali può stimolare l'espressione di molecole di adesione e/o la secrezione di chemochine.



**Fig.10:** Effetti dell'IFN $\gamma$  su diversi tipi cellulari.

### 1.14 Le chemochine

Le chemochine sono piccole proteine basiche (8-10 kDa) ad azione chemiotattica; grazie a questa proprietà, possono attrarre e reclutare diversi tipi cellulari, sia durante il normale processo fisiologico di maturazione e “*trafficking*” dei leucociti tra gli organi linfoidi, sia durante il processo infiammatorio che contribuiscono ad indurre, a mantenere e ad amplificare. Questa funzione risulta di primaria importanza nella protezione dagli agenti infettivi, ma può risultare dannosa quando mantiene ed amplifica risposte infiammatorie croniche, o quando contribuisce a sostenere una risposta immunitaria cronica contro gli antigeni self. Un aspetto da sottolineare è che le chemochine non sono solo prodotte dalle cellule immunitarie infiltranti il tessuto sede di infiammazione, ma anche dalle cellule residenti nel tessuto (78). Le chemochine esercitano i loro effetti legandosi ad una classe di recettori accoppiati a proteine G (79).

In generale la nomenclatura delle chemochine si basa sulla conformazione di un motivo conservato, ricco in cisteine, presente nella porzione amino-terminale: si possono così distinguere quattro famiglie, le chemochine CXC (dove X rappresenta un qualsiasi aminoacido), CC, Cx<sub>3</sub>C e C.

Una proprietà caratteristica delle citochine è la ridondanza, il che comporta non solo che più chemochine possano condividere lo stesso recettore ma anche

che una singola chemochina possa legare recettori diversi. Questa proprietà riduce ovviamente la specificità di un intervento farmacologico, volto ad attenuare l'infiammazione, che abbia come *target* le chemochine (79).

### ***1.15 Le chemochine IFN $\gamma$ inducibili***

Un'eccezione alla regola della ridondanza è rappresentata da un ristretto gruppo di chemochine, appartenenti alla famiglia CXC, che riconoscono come unico recettore CXCR3. Le chemochine che legano CXCR3 si distinguono per il fatto di essere tutte indotte dall'IFN $\gamma$ . Le CXC chemochine sono caratterizzate dal possedere quattro cisteine conservate e dalla presenza di un singolo residuo aminoacidico tra la prima e la seconda cisteina. Le CXC chemochine possono inoltre essere suddivise in due classi in base alla presenza o assenza di una sequenza ELR (ELR: Glu-Leu-Arg) nella regione amino terminale.

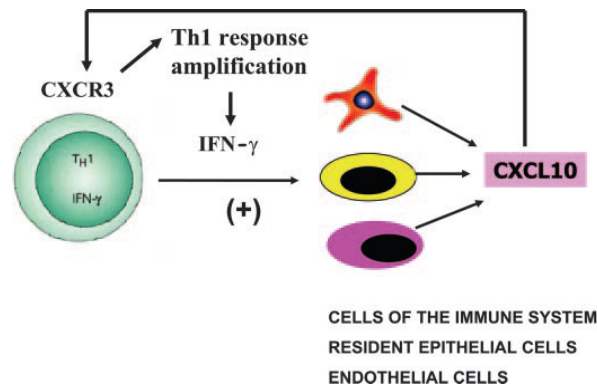
Secondo la vecchia nomenclatura, le tre chemochine CXC che condividono la proprietà di essere inducibili dall'IFN $\gamma$  e legano il recettore CXCR3 sono: IP-10 (IFN $\gamma$ -Inducible Protein of 10 kDa), Mig (*Monokine induced by IFN $\gamma$* ), e I-TAC (IFN $\gamma$ -Inducible T-cell  $\alpha$  Chemoattractant). In base alla nuova nomenclatura le tre chemochine sono rispettivamente CXCL10, CXCL9 e CXCL11 (80).

IP-10, Mig ed I-TAC appartengono alla chemochine ELR-, prive cioè della sequenza ELR, ed attraggono i linfociti, mentre le chemochine ELR+, come ad esempio l'IL-8, attraggono i neutrofili (81). Inoltre, la presenza del motivo ELR sembra correlare con la proprietà angiogenica, mentre la sua assenza con quella angiostatica. Le chemochine CXC ELR+ sono state quindi collegate all'angiogenesi mentre quelle ELR- (IP-10, Mig, I-TAC) ad un'azione antagonizzante l'angiogenesi (78). Inizialmente il recettore CXCR3 è stato trovato espresso sui linfociti B, sulle cellule NK e su linfociti T, in particolare nella sottopopolazione Th1 (82). Sebbene questo avesse fatto pensare che, nell'ambito dei linfociti T, l'espressione di CXCR3 fosse esclusiva della sottopopolazione Th1 e che la presenza o meno del recettore potesse essere quindi un elemento



distintivo tra Th1 e Th2, è stato in seguito dimostrato che la dicotomia nell'espressione del recettore non è così marcata, essendoci più che altro una differenza quantitativa piuttosto che qualitativa (83). In studi successivi è stato osservato che CXCR3 non è espresso solo sulle cellule immunitarie ma anche da cellule residenti quali cellule mesangiali umane (84), periciti vascolari (85), cellule endoteliali umane da microcircolo (86).

Il fatto che i linfociti Th1 producano IFN $\gamma$  che, in diversi tipi cellulari, induce la produzione di PI-10, Mig e I-TAC e che queste citochine, a loro volta, possano attrarre e reclutare i Th1, suggerisce l'esistenza di un *loop* tra linfociti Th1 produttori IFN $\gamma$  e cellule residenti producenti le chemochine leganti CXCR3 (78) (Fig. 11). I linfociti Th2 esprimono prevalentemente recettori di tipo diverso, quali CCR4 e CCR8 e sono reclutati in tessuti *target* dalle citochine CCL17, CCL22 e CCL1. A partire da queste osservazioni si può pensare che le chemochine interagenti con i linfociti T tramite CXCR3 inducano il reclutamento dei Th1 verso i tessuti sede di infiammazione, mentre chemochine specifiche per altri recettori possano reclutare i Th2, responsabili principalmente di stati allergici.



**Fig.11:** Ruolo dell'interazione CXCL10/CXCR3 nell'amplificazione della risposta infiammatoria Th1. Immagine tratta da Rotondi *et al.* (78).

Il ruolo dei ligandi di CXCR3 non sembra essere limitato all'attività chemiotattica nei confronti dei linfociti attivati. Numerosi sono infatti gli studi che evidenziano il ruolo di CXCL10 nell'avvio e nell'amplificazione delle risposte alloimmuni (78). È stato dimostrato che in soggetti sani non allergici le

chemochine CXCL9, CXCL10 e CXCL11 stimolano un aumento di produzione di IFN $\gamma$  specificamente da parte dei linfociti Th1 attivati da allergeni; al contrario i linfociti T provenienti da soggetti allergici, di tipo Th2, sono iporesponsivi ai ligandi di CXCR3 (87). Questi dati attribuiscono ai ligandi di CXCR3 un significato funzionale che va al di là della chemiotassi, suggerendo che la ridotta capacità degli individui allergici di rispondere ai ligandi di CXCR3 possa promuovere il mantenimento dei disordini allergici (87). In linea con questi risultati è stato riportato che CXCL10 stimola la produzione delle citochine Th1 ed inibisce la produzione di citochine Th2 (88).

### ***1.16 Ruolo dei ligandi di CXCR3 nel rigetto da allotrapianto***

Sempre più numerose evidenze cliniche e sperimentali suggeriscono che le chemochine indotte da IFN $\gamma$  leganti CXCR3 (IP-10, Mig, I-TAC) abbiano un ruolo determinante nel promuovere e nell'amplificare la risposta immune del ricevente verso il “*graft*” (organo trapiantato), che può portare sia al rigetto acuto sia al rigetto cronico.

Nel rigetto acuto, ma anche nel cronico, il principale bersaglio responsabile delle manifestazioni è l'endotelio come conseguenza del contatto continuo e diretto con il sistema immunitario del ricevente. È l'endotelio del *graft* infatti, che fornisce la prima esposizione antigenica al sistema immune del ricevente (linfociti CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, cellule NK) stimolandone la risposta, ed è l'endotelio ad essere il primo bersaglio dell'alloreattività (89). I linfociti Th1 e i CD8<sup>+</sup>, attivati dal contatto con gli alloantigeni, rilasciano IFN $\gamma$  che determina l'espressione, da parte delle ECs del *graft* vascularizzato, delle chemochine CXC-IFN $\gamma$  dipendenti (90). Analisi immunoistochimiche o di cDNA array di campioni biotipici di cuori o reni trapiantati suggeriscono che la comparsa di cellule CXCR3 positive, quali linfociti T alloantigene-attivati e cellule NK, sia strettamente correlata alla reazione di rigetto acuto (91-93). Nella stessa direzione vanno i dati ottenuti in modelli murini *knockout* per IP-10 o per il suo recettore CXCR3, in cui il trapianto di cuore non subisce un rigetto acuto ed è permanentemente tollerato (94). Inoltre la

neutralizzazione dell'IP-10 con anticorpi monoclonali prolunga la sopravvivenza del trapianto in modelli di rigetto di allotrapianto di cuore ed intestino (94, 95). Nel complesso tutti questi dati dimostrano l'importanza del legame CXCL10-CXCR3 negli allotrapianti e nello specifico nella patogenesi della perdita d'organo.

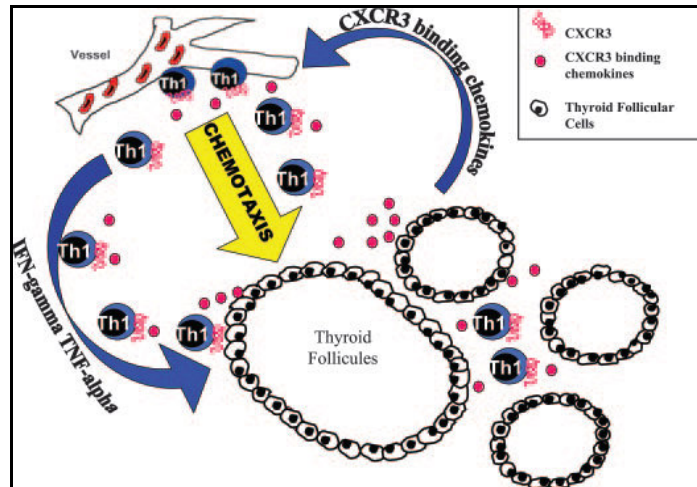
Sia che si parli di trapianto cardiaco che di trapianto di rene il rigetto cronico resta la principale causa di perdita dell'organo nei pazienti trapiantati. Una delle principali manifestazioni del rigetto cronico, è la cosiddetta "*graft arteriosclerosis*" o vasculopatia cronica del trapianto, un quadro clinico che si riscontra in diversi organi trapiantati; nel caso del rene si parla di CAN (nefropatia cronica da allotrapianto), nel caso del cuore di CAV (vasculopatia cardiaca da allotrapianto). La CAV è caratterizzata da un ispessimento concentrico della parete vasale, dovuta alla proliferazione delle cellule muscolari lisce dell'intima delle arterie coronarie, e da un'infiltrazione di cellule mononucleate a livello dell'intima stessa. I meccanismi che portano allo sviluppo di CAN e CAV non sono stati ancora chiariti ma diverse evidenze indicano un coinvolgimento dei linfociti Th1, in particolare del loro principale prodotto, l'IFN $\gamma$  (96), e delle chemochine leganti CXCR3. Analisi immunocitochimiche in arterie coronarie umane con CAV hanno identificato, nell'infiltrato leucocitario sub-endoteliale, una presenza prevalente di macrofagi e linfociti T con un profilo citochinico di tipo Th1 (IFN $\gamma$  secernenti) ed esprimenti il recettore CXCR3 (97). Altre evidenze sperimentali indicano che le chemochine leganti CXCR3 e il recettore CXCR3 stesso sono altamente espressi in concomitanza con lo sviluppo della CAV (81) e della glomerulopatia da trapianto (97). È stato inoltre riportato che CXCL10 è in grado di alterare le funzioni di cellule endoteliali e muscolari lisce favorendo lo sviluppo della CAN (78). La tecnica gold standard per diagnosticare il rigetto prevede una biopsia dell'organo ed è quindi una tecnica di tipo invasivo e non priva di rischi. Per questo motivo numerosi sforzi sono stati fatti per identificare dei possibili marker predittivi di tipo non invasivo. È stato rilevato che i livelli urinari di CXCL9 sono dei predittori specifici e sensibili del rigetto acuto di rene e

rispecchiano anche la risposta alla terapia antirigetto (98). Un dato contrastante è stato ottenuto da Karason *et al.* che hanno rilevato come il livello sierico di CXCL9 non sembri essere un marker affidabile per il monitoraggio del rigetto di cuore (99). Un approccio diverso è stato quello di Rotondi *et al.* che hanno valutato, in pazienti sottoposti a trapianto renale, se i livelli di concentrazione di IP-10 pre-trapianto potessero costituire un valore predittivo del rischio di rigetto: in effetti è stato osservato che pazienti con un *graft* funzionante, prima del trapianto presentavano valori sierici di CXCL10 significativamente più bassi di quelli di pazienti andati incontro a perdita del trapianto (100).

### ***1.17 Ruolo dei ligandi di CXCR3 nelle patologie endocrine autoimmuni***

La tiroide è uno dei più comuni *target* dei fenomeni di autoimmunità. Attraverso tecniche immunoistochimiche, è stato dimostrato un significativo aumento di espressione di CXCL9 e di CXCL10 in campioni di tessuto tiroideo derivanti da pazienti affetti da tiroidite di Hashimoto rispetto a campioni di tessuto tiroideo sano (101). Utilizzando in combinazione la tecnica di ibridazione *in situ* e l'immunoistochimica è stato inoltre evidenziato che anche in tireociti di pazienti affetti da Graves vi è una iper-espressione di CXCL9 e CXCL10 (102). Per quanto riguarda il recettore CXCR3 esso è stato trovato espresso non nei tireociti ma solo a livello dei linfociti infiltranti la tiroide e nelle cellule endoteliali (102). È stato inoltre osservato che non vi sono variazioni nell'espressione di CXCR3 tra i linfociti da sangue periferico dei pazienti affetti da Graves ed i linfociti di controlli sani. Il fatto che i linfociti infiltranti la tiroide mostrino un pattern di espressione del recettore CXCR3 diverso da quello dei linfociti di sangue periferico dello stesso paziente suggeriscono che, nella malattia di Graves, CXCR3 abbia un ruolo nel reclutare i linfociti T verso la tiroide (103). Nel loro insieme queste osservazioni permettono di dire che le cellule follicolari della tiroide possono modulare la risposta autoimmune attraverso la produzione di CXCL9 e CXCL10. Queste chemochine possono indurre la migrazione verso la

tiroide dei linfociti Th1 che a loro volta secernono  $\text{IFN}\gamma$ . L' $\text{IFN}\gamma$ , stimolando la produzione di chemochine da parte delle cellule follicolari, perpetua la cascata autoimmune (79) (Fig. 12).

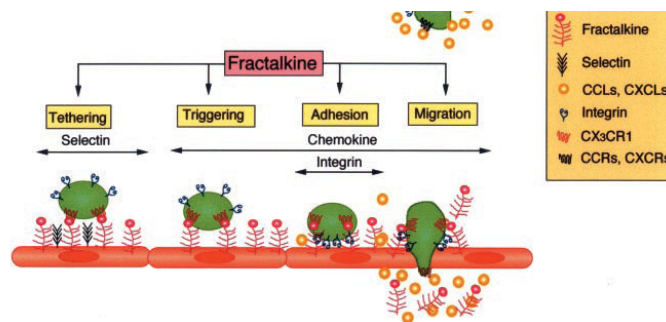


**Fig.12:** Schematica rappresentazione dell'ipotizzato meccanismo di reclutamento linfocitario, mediato da chemochine leganti CXCR3, che si instaura nelle patologie endocrine autoimmuni. Immagine tratta da Rotondi *et al.* (78).

### 1.18 Fractalkina

La fractalkina è l'unica appartenente alla classe delle CX3C-chemochine ed ha la particolarità di poter funzionare sia da chemochina, quando è nella forma solubile, sia da molecola di adesione cellulare quando si trova nella forma legata alla membrana. È stato osservato che in ECs primarie l'espressione della fractalkina può essere marcatamente indotta dalle citochine pro-infiammatorie  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 e  $\text{IFN}\gamma$  (104). La forma solubile, liberata presumibilmente per proteolisi da parte dell'enzima TACE ( $\text{TNF}\alpha$ -converting enzyme), mostra una spiccata attività chemiotattica nei confronti dei monociti, cellule NK, e linfociti T  $\text{CD8}^+$  (citotossici) tutti esprimenti il recettore per la fractalkina CX3CR1 (104). Prima dell'identificazione della fractalkina si riteneva che, per mantenere un gradiente chemochinico locale, le chemochine secrete dovessero associarsi ai proteoglicani di superficie o alle componenti della matrice tissutale (ad esempio i glicosaminoglicani); nel caso della fractalkina questo non sarebbe necessario in

quanto il dominio chemochinico è portato in cima ad uno stelo simil-mucina inserito nella membrana (105). Sembra quindi che, mentre la forma solubile serve a reclutare i monociti/macrofagi e le cellule immunitarie con funzioni effettrici di tipo citotossico/citolitico (NK, linfociti T CD8<sup>+</sup>), la forma espressa alla membrana delle ECs in corso di infiammazione ne favorisca invece la cattura e la migrazione nel tessuto (Fig. 13).



**Fig.13:** Modello schematico del meccanismo di adesione leucocitario mediato dalla fractalkina. Immagine tratta da Umehara *et al.* (105).

Il lavoro di Fraticelli *et al.* ha evidenziato come una regolata espressione della fractalkina a livello delle ECs parteciperebbe al circuito di orientamento ed amplificazione della risposta infiammatoria di tipo Th1 (106). Infatti, mentre l'IFN $\gamma$  determina, a livello delle ECs, un aumento di espressione della fractalkina questo non si verifica sotto stimolo di IL-4 e IL-13 che, al contrario, ne sopprimono l'induzione. Questi risultati indicano come citochine tipiche di una risposta polarizzata Th1 (IFN $\gamma$ ) e citochine tipiche della risposta Th2 (IL-4 e IL-13) abbiano effetti divergenti sull'espressione della fractalkina. A completare il quadro vi è poi il dato che l'espressione del recettore CX3CR1 è preferenzialmente espresso sui linfociti Th1 piuttosto che sui Th2 (106). Un'inappropriata espressione o funzione della fractalkina può essere quindi coinvolta in quelle condizioni infiammatorie che portano a danno vascolare o tissutale. Recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato un coinvolgimento della fractalkina nella patogenesi di diverse malattie quali l'aterosclerosi, la glomerulonefrite, il rigetto cardiaco (105). Robinson *et al.* hanno riportato che, nel corso di rigetto cardiaco, nel tessuto vascolare e nell'endotelio vi è un

significativo aumento nell'espressione della fractalkina e che il trattamento con anticorpi bloccanti anti-CX3CR1 prolunga significativamente la durata della sopravvivenza del *graft* (107).

### **1.19 I tiazolidinedioni**

I tiazolidinedioni (TZD) sono una nuova classe di farmaci utilizzati nel trattamento del diabete mellito di tipo 2 (T2DM) per la loro azione ipoglicemizzante ed insulino-sensibilizzante. Sono tuttavia sempre più numerose le evidenze sperimentali che attribuiscono ai TZD proprietà che vanno al di là della loro capacità di regolare il metabolismo lipidico e l'omeostasi glicidica; in particolare sono oggetto di studio la loro azione anti-infiammatoria e le loro proprietà antineoplastiche. I TZDs sono quindi composti con effetti pleiotropici ed i meccanismi alla base della loro azione farmacologica sono in parte da chiarire.

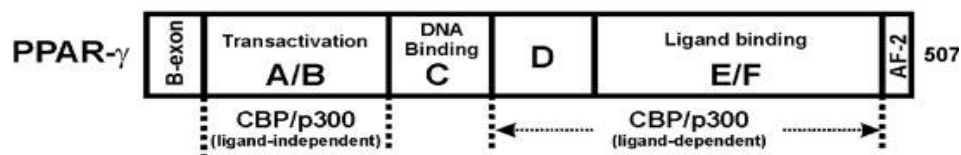
I TZDs sono ligandi sintetici di PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor*  $\gamma$ ) un fattore trascrizionale appartenente alla famiglia dei recettori nucleari attivati da ligando. Molti degli effetti dei TZDs sono esercitati attraverso la modulazione dell'attività trascrizionale di PPAR $\gamma$  (meccanismi PPAR $\gamma$ -dipendenti) ma numerose sono le evidenze sperimentali che attribuiscono ai TZDs delle azioni che non dipendono dal recettore PPAR $\gamma$  (meccanismi PPAR $\gamma$ -indipendenti) (108). A complicare ulteriormente il quadro sono stati rilevati degli effetti rapidi dei TZDs che, proprio a causa della rapidità con cui avvengono, non sono compatibili con un meccanismo di regolazione dell'attività trascrizionale(109): resta da chiarire se questi effetti, pur “non genomici”, siano mediati o meno dal recettore PPAR $\gamma$ .

### **1.20 PPARs e loro caratteristiche strutturali**

Ad oggi sono stati identificati tre sottotipi di PPARs (*peroxisome proliferator activated receptors*), PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta\delta$  e PPAR $\gamma$ , ciascuno dei quali ha una distinta distribuzione tissutale e una specifica attività biologica. Nell'uomo sono

state identificate tre isoforme di PPAR $\gamma$  ( $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2,  $\gamma$ 3) generate a partire da promotori diversi o per splicing alternativo. PPAR $\gamma$ 1 si trova in tessuti diversi (fegato, muscolo scheletrico, rene, intestino) mentre PPAR $\gamma$ 2 è quasi esclusivamente espresso a livello del tessuto adiposo dove regola l'adipogenesi; PPAR $\gamma$ 3 è abbondante nei macrofagi e nel tessuto adiposo bianco (110). I PPARs regolano la trascrizione di geni *target* coinvolti nel metabolismo lipidico, nell'omeostasi glicidica e nel differenziamento cellulare in particolare del tessuto adiposo (111).

I PPARs, come altri recettori nucleari, condividono una struttura modulare suddivisibile in quattro domini funzionali (Fig. 14). La porzione amino-terminale A/B contiene un dominio di transattivazione indipendente dal ligando (AF1) fondamentale per la regolazione dell'attività di PPAR tramite fosforilazione MAPK dipendente. Il dominio C, contenente il motivo zinc-finger di legame con il DNA, riconosce nelle regioni promotrici dei geni *target* specifiche sequenze dette PPRE (PPAR Response Element). Il dominio D è essenziale per legare cofattori. La porzione carbossi-terminale E/F contiene sia il dominio di legame per il ligando sia il dominio AF2 che lega cofattori essenziali per il processo di trascrizione genica (110).



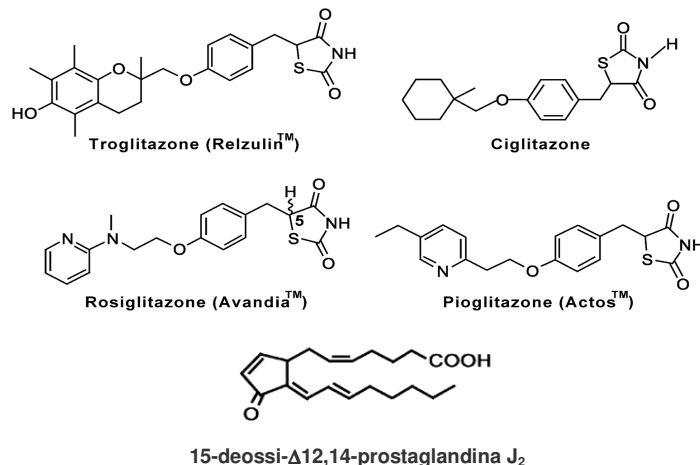
**Fig.14:** Schematica rappresentazione dei domini strutturali di PPAR $\gamma$ .

### 1.21 Ligandi sintetici ed endogeni di PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$ , oltre ad essere attivato da agonisti sintetici della famiglia dei TZDs quali rosiglitazone (RGZ), pioglitazone (PIO), troglitazone (TRO), ciglitazone (CIG), ha numerosi ligandi endogeni tra cui acidi grassi polinsaturi a lunga catena (acido linoleico, acido arachidonico), derivati eicosanoidi e lipidi ossidati (9-HODE, 15-HETE). La 15-deossi- $\Delta$ 12,14-prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) sembra



essere il più potente ligando endogeno di PPAR $\gamma$  (112) (Fig. 15). Comunque, questi ligandi endogeni sono capaci di attivare PPAR $\gamma$  *in vitro*; data la loro bassa affinità per PPAR $\gamma$  ed i loro livelli di concentrazione molto bassi nella cellula, non vi è quindi la certezza che *in vivo* essi siano gli effettivi ligandi di PPAR $\gamma$  (113). Ad oggi sono i ligandi sintetici i più potenti attivatori di PPAR $\gamma$  conosciuti.



**Fig.15:** Strutture chimiche degli agonisti di PPAR $\gamma$ .

### 1.22 Meccanismi di regolazione della trascrizione genica PPAR $\gamma$ dipendenti

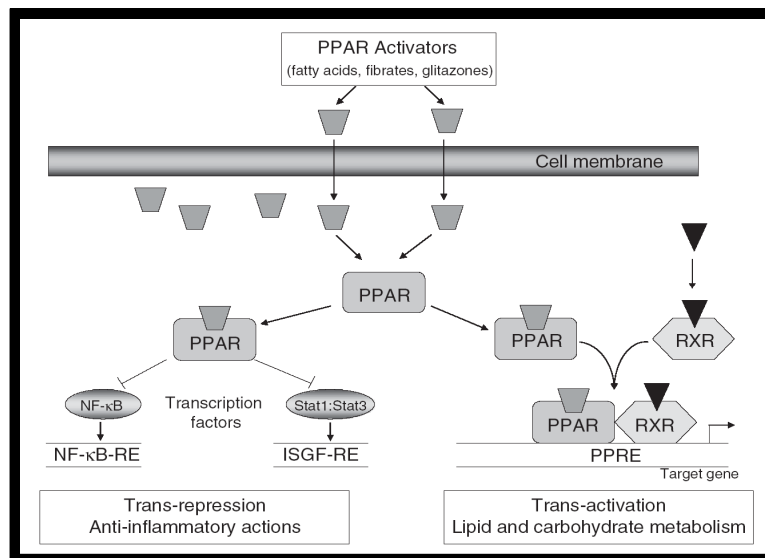
PPAR $\gamma$ , attivato dal legame con il ligando, regola la trascrizione genica principalmente attraverso due meccanismi (Fig. 16):

1. un meccanismo di trans-attivazione trascrizionale che prevede la formazione di un eterodimero tra PPAR $\gamma$  e RXR (il recettore per l'acido 9 *cis* retinoico) ed il legame a specifici elementi di risposta PPRE a livello del promotore dei geni *target*. Nonostante tutto il processo non sia del tutto chiarito, si ritiene che, in assenza del ligando, il complesso eterodimerico PPAR $\gamma$ /RXR sia già formato ma mantenuto inattivo da specifici co-repressori. Il cambiamento conformazionale innescato dal legame con il ligando spazzerebbe i

co-repressori e permetterebbe il reclutamento di co-attivatori essenziali per l'avvio della trascrizione genica quali ad esempio le HAT (*Histone Acetyl Transferase*) che, acetilando gli istoni, rendono più accessibile il DNA al complesso trascrizionale (113).

2. un meccanismo di trans-repressione trascrizionale (o “*squelching*”) che non prevede un legame al DNA ma un’associazione fisica tra eterodimero PPAR $\gamma$ /RXR e fattori trascrizionali attivati di altre vie di segnalazione (NF- $\kappa$ B, AP1, STATs) che interferisce negativamente con la trascrizione stessa. Anche il “sequestro”, da parte dell’eterodimero, di cofattori presenti in quantità limitanti ed essenziali per la piena attività di altri fattori trascrizionali può costituire un modo di regolare negativamente la trascrizione (112).

La trans-attivazione sembra essere il principale meccanismo con il quale i TZDs esercitano il loro effetto sul metabolismo glicidico e lipidico; la trans-repressione invece, sembra essere la modalità con cui i TZDs esercitano la loro azione anti-infiammatoria (Fig. 16).



**Fig.16:** Meccanismi di regolazione della trascrizione genica PPAR $\gamma$ -dipendenti. Immagine tratta da Touyz *et al.* (114).

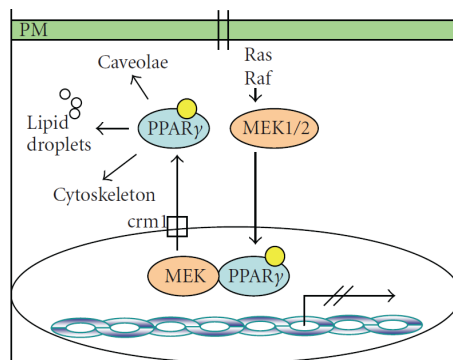
### 1.23 “Crosstalk” tra PPAR $\gamma$ e ERK1/2

È noto che l'attività di PPAR $\gamma$  può essere regolata anche tramite fosforilazione. Sono state individuate più vie coinvolte nella regolazione di PPAR $\gamma$  tramite fosforilazione tra cui la via della PKA (cAMP-dependent kinase), dell'AMPK (AMP-activated protein kinase) e della MAPK (115).

La via di “*signaling*” mediata da MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), chiamata anche via di ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*), è una tra le più importanti vie coinvolte nella regolazione della crescita, nel differenziamento e nella sopravvivenza cellulare. Gli effettori a valle di questa via, oltre a ERK1/2, sono altre chinasi appartenenti alla famiglia delle MAPK tra cui JNK e p38MAPK.

Per quanto riguarda la via di ERK, il “*crosstalk*” tra ERK1/2 e PPAR $\gamma$  può avvenire in due modi (115). Il primo prevede una fosforilazione diretta di PPAR $\gamma$  ad opera di ERK1/2 che regola negativamente l'attività trascrizionale del recettore. Nell'uomo la fosforilazione dei residui Ser 84 su PPAR $\gamma$ 1 e Ser 114 su PPAR $\gamma$ 2, entrambi localizzati nella regione AF1, sopprime l'attività trascrizionale del recettore. Inoltre, si ritiene che PPAR $\gamma$  fosforilato sia più suscettibile a subire altre modifiche post-traduzionali (sumoilazione, ubiquitinazione) che ne causano la rapida degradazione da parte del proteasoma, evento questo che promuove ulteriormente l'azione *down*-regolatrice di MAPK (116). Un'altra interessante teoria propone che a seguito della fosforilazione di PPAR $\gamma$  si possa formare un dimero tra la subunità p65 di NF- $\kappa$ B e PPAR $\gamma$  stesso; questa interazione determinerebbe l'inibizione dell'attività trascrizionale di entrambi i fattori (117). È stato recentemente dimostrato che l'attività genomica di PPAR $\gamma$  può essere modulata anche attraverso un meccanismo di compartimentalizzazione mediato da MEK1/2 (la chinasi attivante ERK). MEK1 veicolerebbe PPAR $\gamma$  dal nucleo al citoplasma attraverso la formazione di un'interazione reversibile tra il suo dominio N-terminale e il dominio AF2 di PPAR $\gamma$ . Questo trasporto dal nucleo al

citoplasma determinerebbe una riduzione delle funzioni genomiche di PPAR $\gamma$  (118) (Fig. 17).



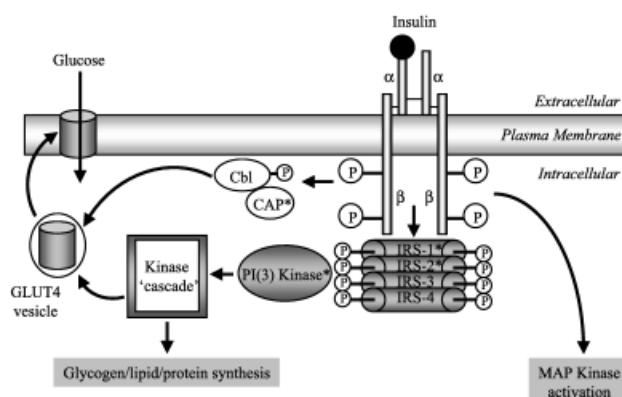
**Fig.17:** La traslocazione di PPAR $\gamma$  dal nucleo al citosol mediata da MEK1 può inibire le funzioni genomiche di PPAR $\gamma$  e favorirne le interazioni con proteine citoplasmatiche. Immagine tratta da Burgermeister *et al.* (118).

Il secondo tipo di *crosstalk* tra ERK1/2 e PPAR $\gamma$  riguarda i cosiddetti effetti non genomici dei ligandi di PPAR $\gamma$ . Recenti studi hanno evidenziato come gli agonisti di PPAR $\gamma$  possano avere, a parte gli effetti genomici a lungo termine, anche un'azione rapida (entro i 15') che non prevede quindi una modulazione dell'attività genomica. Questi effetti non genomici prevedono una risposta rapida come ad esempio l'attivazione di vie di *signaling* intracellulare (119) o la perturbazione della bioenergetica mitocondriale (120). L'attivazione della via di MAPK da parte dei ligandi di PPAR $\gamma$  è stata studiata soprattutto a livello delle VSMCs (cellule muscolari lisce vascolari) dove è stato dimostrato che TRO, PIO e 15d-PGJ<sub>2</sub> inducono una rapida fosforilazione di ERK1/2 tramite la via della PI3K (Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase) (119).

### 1.24 Effetti insulino-sensibilizzanti dei ligandi di PPAR $\gamma$

Nonostante siano numerosissime le evidenze sperimentali che provano il ruolo dei ligandi di PPAR $\gamma$  nella regolazione della sensibilità-insulinica, i meccanismi con cui questo avviene non sono del tutto chiariti. La maggiore difficoltà incontrata è stato cercare di spiegare come un recettore, che è

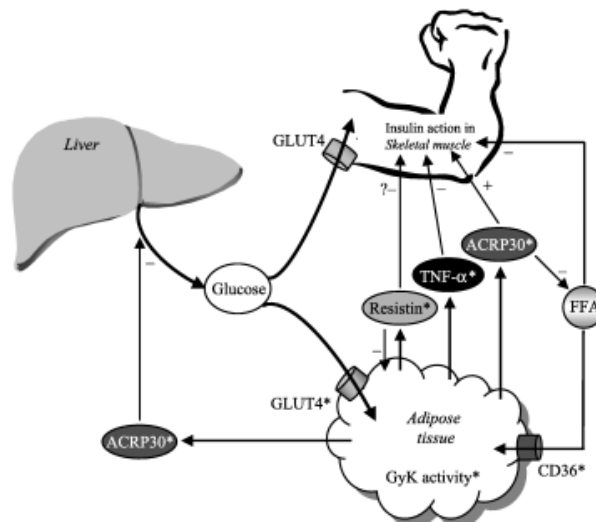
prevalentemente espresso nel tessuto adiposo, potesse esercitare un così profondo effetto sul metabolismo glicidico di altri organi, quali fegato e muscolo scheletrico (121). Infatti, nonostante sia stato osservato che, a livello degli adipociti, i TZDs determinano un aumento di espressione del trasportatore di glucosio GLUT4 o di altre proteine coinvolte nel “*signaling*” insulinico (IRS-1, IRS-2, la subunità p85 della PI3K), il tessuto adiposo è responsabile solo di un 5% di smaltimento del glucosio e questo non basterebbe quindi a spiegare i potenti effetti di questi farmaci (121, 122) (Fig. 18).



**Fig.18:** Potenziali siti di regolazione, da parte di PPARγ, dell'omeostasi glicidica. Le molecole la cui espressione o secrezione è regolata da PPARγ sono contrassegnate da un asterisco. Immagine tratta da Gurnell M. (121).

L'ipotesi più accreditata è che i TZDs esercitino la loro azione insulino-sensibilizzante in due modi, uno diretto sul tessuto adiposo (ipotesi del “fatty acid steal”) ed uno indiretto, agendo sul rilascio da parte del tessuto adiposo di adipochine che vanno a modulare la sensibilità insulinica al di fuori del tessuto adiposo (123). La modalità diretta prevede che i TZDs promuovano l'uptake e l'accumulo degli acidi grassi liberi nel tessuto adiposo: in questo modo, incrementando la massa del tessuto adiposo, salvaguardano gli altri tessuti insulino-sensibili (fegato, muscolo scheletrico, cellule β pancreatiche) dai dannosi effetti metabolici derivanti da un'alta concentrazione di acidi grassi liberi (123). In altre parole si potrebbe dire che i TZDs “mantengono il grasso dove deve stare”, cioè nel tessuto adiposo.

La modalità indiretta con cui i TZDs migliorano la sensibilità insulinica prevede la modulazione dell'espressione delle adipochine, molecole prodotte dagli adipociti che esercitano un'importante azione sia locale che a livello sistemico sul metabolismo (Fig. 19).



**Fig.19:** Regolazione dell'omeostasi glicidica da parte delle adipochine. Le molecole la cui espressione o secrezione è regolata da PPAR $\gamma$  sono contrassegnate da un asterisco. Immagine tratta da Gurnell M. (121).

Studi di espressione genica in adipociti 3T3L-1 hanno evidenziato come RGZ e PIO regolano l'espressione di più di 100 geni: tra questi vi sono quelli di numerose adipochine quali adiponectina (Acrp30), TNF $\alpha$ , resistina e leptina (123). In particolare è stato osservato che gli agonisti di PPAR $\gamma$  aumentano l'espressione di adiponectina, nota per le proprietà insulino-sensibilizzanti, e inibiscono quella di TNF $\alpha$  resistina e leptina note, invece, per indurre insulino-resistenza (122, 123). Inoltre, l'attivazione di PPAR $\gamma$  sembra mediare l'aumento dell'ossidazione del glucosio a livello muscolare e la diminuzione della glicogenesi a livello del fegato (122).

### 1.25 Meccanismi PPAR $\gamma$ -indipendenti

Numerosi sono i dati che dimostrano che, oltre ad agire tramite il proprio recettore, gli agonisti di PPAR $\gamma$  hanno delle azioni indipendenti da PPAR $\gamma$ ,

definite talvolta come azioni “non genomiche” in contrapposizione alle azioni “genomiche” mediate dal recettore. Castrillo *et al.* hanno riportato che la 15d-PGJ<sub>2</sub> (ligando endogeno di PPAR $\gamma$ ) inibisce la secrezione di TNF $\alpha$  e IL-6 in macrofagi stimolati con lipopolisaccaride attraverso l’inibizione diretta del complesso dell’IkB-chinasi (IKK) che, prevenendo la degradazione di IkB, si associa ad una repressione dell’attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B (124). Staus *et al.* hanno dimostrato che la 15d-PGJ<sub>2</sub> oltre ad inibire IKK riduce l’attività di NF- $\kappa$ B determinando un’alchilazione del dimero p50/p65 (125). A rafforzare le prove a sostegno di un’azione PPAR $\gamma$ -indipendente dei ligandi di PPAR $\gamma$  vi è anche il lavoro di Chawla *et al.*: attraverso la ricombinazione omologa hanno ottenuto cellule staminali embrionali *knockout* per PPAR $\gamma$  ed hanno dimostrato che queste possono differenziare a macrofagi se trattate con TZDs. Inoltre hanno osservato che la 15d-PGJ<sub>2</sub> può inibire la secrezione di TNF $\alpha$  e IL-6 sia in macrofagi wild-type che in macrofagi privi di PPAR $\gamma$  (126). Questi dati dimostrano che i ligandi di PPAR $\gamma$  possono indurre differenziamento ed avere effetti anti-infiammatori indipendentemente dalla presenza del recettore PPAR $\gamma$ .

Anche molti degli effetti antineoplastici attribuibili ai TZDs possono essere spiegati con un meccanismo di azione PPAR $\gamma$ -indipendente. La sensibilità di linee cellulari tumorali all’inibizione della crescita indotta dai TZDs non correla ad esempio con le quantità di PPAR $\gamma$  (112). Inoltre nel lavoro di Galli *et al.* si evidenzia come due TZDs, RGZ e PIO, inibiscono, in modo dose dipendente, l’invasività di linee cellulari di carcinoma pancreatico, sia che queste esprimano sia che non esprimano PPAR $\gamma$  (127). Anche Yang *et al.* hanno rilevato che l’effetto anti-invasivo del TRO in cellule ES-2 di carcinoma umano non è revertito dal silenziamento di PPAR $\gamma$ , a prova del fatto che l’agonista di PPAR $\gamma$  inibisce la migrazione cellulare con un meccanismo indipendente dal recettore PPAR $\gamma$  (128). In numerose linee cellulari tumorali è stato osservato che il trattamento con agonisti di PPAR $\gamma$  induce una rapida attivazione di ERK1/2 con

un meccanismo sicuramente non genomico ma in cui non è chiaro se sia o meno coinvolto il recettore PPAR $\gamma$  (115).

### ***1.26 Effetti antineoplastici dei ligandi di PPAR $\gamma$***

Numerosi sono i dati presenti in letteratura che attribuiscono ai TZDs effetti antineoplastici. È stato riportato che i TZDs inibiscono la crescita di alcune linee cellulari tumorali epiteliali e, in cellule tumorali da colon o mammella, inducono sia una riduzione del tasso di crescita sia cambiamenti morfologici e di espressione genica tipici di uno stato più differenziato (127). Inoltre, in alcuni carcinomi di colon e tiroide sono state trovate delle mutazioni di PPAR $\gamma$  di tipo inattivante (129, 130).

Alla base degli effetti antineoplastici dei TZDs possono esserci meccanismi di tipo diverso, pro-apoptotici, antiproliferativi, pro-differenzianti ed anti-angiogenetici. In cellule umane di astrocitoma maligno e in cellule di carcinoma epatico l'attivazione di PPAR $\gamma$  porta ad un aumento dell'attività della caspasi 3, mentre nelle cellule C6 di glioma di ratto il trattamento con ligandi di PPAR $\gamma$  induce apoptosi grazie ad un aumento di espressione delle proteine pro-apototiche BAX e BAD (112). È stato osservato che gli agonisti di PPAR $\gamma$  possono promuovere, in diversi tipi cellulari, l'arresto del ciclo cellulare inibendo l'espressione della ciclina D1 o aumentando quella di p18 e p21 due noti inibitori del ciclo cellulare (112). In linee cellulari di carcinoma pancreatico gli agonisti di PPAR $\gamma$  inducono un aumento dell'espressione di diversi markers di differenziamento quali l'E-caderina la fosfatasi alcalina e il CEA (Antigene Carcino Embrionale) (131). Panigrahy *et al.* hanno dimostrato che il RGZ sopprime la crescita tumorale e le metastasi attraverso meccanismi anti-angiogenetici diretti e indiretti; in particolare il RGZ determina una riduzione della produzione di VEGF da parte delle cellule tumorali (132).

Recentemente è stato osservato sia *in vitro*, in diverse linee cellulari tumorali, sia *in vivo*, in modelli murini di tumori spontanei chimicamente indotti o



trapiantati (via iniezione di cellule tumorali), che gli agonisti di PPAR $\gamma$ , RGZ e GW1929, sinergizzano con il carboplatino attraverso la soppressione, in parte PPAR $\gamma$ -dipendente, delle metallothioneine, proteine coinvolte nella resistenza alle terapie con farmaci a base di platino (133).

Comunque occorre sottolineare che non mancano risultati controversi: in alcuni modelli animali ed in alcuni trial clinici pilota, i TZDs sembrano o non avere effetto o aver proprietà tumorigeniche (134, 135).

### ***1.27 Effetti anti-infiammatori dei ligandi di PPAR $\gamma$***

Il fatto che PPAR $\gamma$  sia espresso, oltre che nel tessuto adiposo, anche nelle cellule della parete vascolare, ECs, VSMCs, e nei macrofagi ha subito fatto ipotizzare che potesse avere un ruolo nei meccanismi infiammatori ed in particolare nell'aterosclerosi, malattia caratterizzata da uno stato infiammatorio cronico.

Le prime osservazioni sugli effetti antiinfiammatori dei ligandi di PPAR $\gamma$  sono state quelle di Jiang *et al.* che hanno dimostrato come il trattamento con TZDs o 15d-PGJ<sub>2</sub> sia in grado di inibire l'espressione di TNF $\alpha$ , IL-6, e IL-1 $\beta$  in monociti attivati con PMA (phorbol myristate acetate) (136). Nello stesso anno il gruppo di Ricote, mediante esperimenti di trasfezione transiente, dimostrava che gli agonisti di PPAR $\gamma$  inibiscono l'espressione della iNOS (nitrossido sintasi inducibile) della MMP-9 (*matrix metalloprotease-9*) e dello scavenger receptor-A attraverso un meccanismo di trans-repressione trascrizionale, antagonizzando i fattori trascrizionali AP1, STAT ed NF- $\kappa$ B (137). Un altro importante effetto anti-infiammatorio dei ligandi di PPAR $\gamma$  è legato alla loro capacità di interferire negativamente con la transattivazione del promotore dell'IFN $\gamma$  (138): questo infatti contiene molti elementi di risposta per fattori trascrizionali essenziali quali AP1, NF- $\kappa$ B e STAT che possono essere "sequestrati" da PPAR $\gamma$  attivato. Tuttavia sono state anche documentate azioni antiinfiammatorie dei TZDs non mediate da PPAR $\gamma$ : in macrofagi PPAR $\gamma$  -/- gli agonisti di PPAR $\gamma$  determinano

comunque un'inibizione dell'espressione di geni coinvolti nell'infiammazione (TNF $\alpha$ , IL-6) (126).

In cellule dendritiche (DCs), le più potenti cellule presentanti l'antigene, i ligandi di PPAR $\gamma$  riducono la secrezione di IL-12, citochina che gioca un ruolo chiave sia nella polarizzazione verso linfociti Th1 sia nell'aterosclerosi (111); inoltre, sempre nelle DCs, l'attivazione di PPAR $\gamma$  da parte di RGZ, PIO o TRO influenza l'espressione di markers di superficie quali CD80 e CD86 (importanti molecole co-stimolatorie) ed inibisce la sintesi di IP-10 e RANTES (CCL5), chemochine coinvolte nel reclutamento dei Th1 (139). Inoltre, è stato descritto che in cellule endoteliali i ligandi di PPAR $\gamma$  sono in grado di inibire l'espressione, indotta da IFN $\gamma$ , di IP-10, Mig e I-TAC sia a livello di mRNA che a livello proteico (140); tramite esperimenti di trasfezione transiente e saggi EMSA gli autori hanno dimostrato che gli agonisti di PPAR $\gamma$  agiscono inibendo l'attività del promotore dell'IP-10 e, in particolare, che questo non avviene attraverso l'inibizione dei fattori trascrizionali leganti l'elemento ISRE del promotore ma piuttosto attraverso l'inibizione del legame di NF- $\kappa$ B ai due elementi kB anch'essi presenti nel promotore dell'IP-10 (140). Gli effetti dei ligandi di PPAR $\gamma$  sulla secrezione di IP-10 indotta da citochine infiammatorie sono stati studiati anche in colture primarie di tireociti, fibroblasti e preadipociti retrobulbari provenienti da pazienti con oftalmopatia di Graves' (141). In tutti i tipi cellulari è stato osservato che la secrezione di IP-10, indotta a seguito di un trattamento con TNF $\alpha$  più IFN $\gamma$ , era inibita, in modo dose dipendente, dalla contemporanea presenza di RGZ. Questi ultimi dati suggeriscono che l'attività di PPAR $\gamma$  possa essere coinvolta nella regolazione dell'espressione chemochinica indotta da IFN $\gamma$ , che si associa ai fenomeni di autoimmunità, attenuando il reclutamento dei linfociti T attivati verso i siti di infiammazione Th1-mediata (139, 140).

In generale quindi i dati *in vitro* sull'azione anti-infiammatoria dei TZDs sono solidi; a questi si sommano numerosi dati *in vivo* che comprovano l'azione anti-infiammatoria dei TZDs.

È stato riportato che il RGZ riduce l'espressione di iNOS, COX-2, ICAM-1 e P-selectina nei polmoni di ratti trattati con carragenina (modello animale di infiammazione acuta) e che questo potente effetto inibitorio è revertito dal pretrattamento con il BADGE (Bisphenol A Diglycidyl Ether), un antagonista di PPAR $\gamma$ , a dimostrazione di un effetto PPAR $\gamma$  mediato (142).

Infine, anche da studi clinici, soprattutto su pazienti diabetici trattati con TZDs, sono emersi dati a sostegno dell'effetto anti-infiammatorio di questi farmaci. È stato osservato che in pazienti con T2DM il trattamento con RGZ determina una significativa riduzione dei livelli plasmatici di markers infiammatori quali MCP-1 e proteina C reattiva (143).

Nel loro insieme questi dati suggeriscono un potenziale uso terapeutico dei TZDs nel trattamento di innumerevoli patologie su base infiammatoria, dalle malattie autoimmuni, al rigetto da trapianto, alla disfunzione endoteliale all'aterosclerosi. Gli effetti esercitati dai ligandi di PPAR $\gamma$  in diverse cellule del sistema immunitario (monociti/macrofagi, cellule dendritiche) e in cellule della parete vascolare (ECs, VSMCs), tutte esprimenti PPAR $\gamma$ , suggeriscono che PPAR $\gamma$  possa influenzare la risposta infiammatoria anche in specifiche sedi anatomiche (122). A questo proposito, la possibilità che i TZDs, grazie alla loro azione anti-infiammatoria, possano contrastare i processi alla base dell'insorgenza dell'aterosclerosi ha ovviamente suscitato grande interesse soprattutto in considerazione del fatto che il diabete, condizione nella quale è questi farmaci sono ampiamente usati, rappresenta un noto fattore di rischio per l'aterosclerosi (144). I dati presenti in letteratura sono tuttavia alquanto conflittuali soprattutto alla luce di una recente meta-analisi che ha dimostrato come l'uso del RGZ sia associato ad un significativo aumento di rischio di infarto del miocardio e ad un aumentato rischio di morte per cause cardiovascolari con una significatività borderline (145). Nonostante i limiti dello studio, sottolineati dagli stessi autori, questi risultati, ponendo seri dubbi sulla sicurezza del farmaco, suggeriscono un'attenta valutazione dei rischi e benefici e soprattutto sollecitano la necessità di studi su più vasta scala.

### ***1.28 PPAR $\gamma$ all'interfaccia tra metabolismo e infiammazione***

Numerosi dati presenti in letteratura stanno contribuendo a far emergere un nuovo concetto secondo il quale PPAR $\gamma$  si troverebbe all'interfaccia tra metabolismo e sistema immunitario (113). Dallo studio dell'attività trascrizionale di PPAR $\gamma$  si è arrivati ad individuare un set di geni coinvolti nel trasporto e nel metabolismo dei lipidi e sotto il diretto controllo di PPAR $\gamma$ . Il dato interessante e sorprendente è che PPAR $\gamma$  è attivo anche nelle cellule del sistema immunitario ed esercita le sue funzioni regolando la trascrizione di un set di geni molto simile al precedente (146). Szatmari *et al.* hanno dimostrato che PPAR $\gamma$ , durante lo sviluppo da monociti a cellule dendritiche, regola primariamente una serie di geni coinvolti nel metabolismo lipidico e poi via questi, indirettamente, determina quelle modifiche fenotipiche che portano a cellule dendritiche (146). Il fatto che PPAR $\gamma$  sia espresso sia in un tessuto chiave dal punto di vista metabolico sia nelle cellule del sistema immunitario suggerisce che PPAR $\gamma$  possa essere un regolatore chiave che collega il metabolismo all'immunità (113).

## **Obiettivo della ricerca**

L'ambito in cui si colloca il nostro studio è quello infiammatorio in particolare in un contesto di tipo Th1 ed i principali protagonisti sono l'endotelio da microcircolo ed i tiazolidinedioni, una classe di farmaci utilizzati nel trattamento del diabete mellito di tipo 2 a cui, recentemente, numerosi studi hanno attribuito anche effetti anti-infiammatori. Il modello cellulare scelto è stato quello delle HMEC-1, cellule endoteliali umane da microcircolo, ed il contesto infiammatorio è stato ricreato mediante stimoli con TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , le due principali citochine che, durante una risposta infiammatoria di tipo Th1,

coordinano le interazioni tra linfociti/macrofagi infiltranti e le cellule residenti in un tessuto.

Il primo obiettivo che ci siamo posti è stato quello di studiare la risposta delle cellule endoteliali all'insulto infiammatorio, sia in termini di secrezione citochinica che di espressione di molecole di adesione cellulare. A seguito del trattamento con  $\text{TNF}\alpha$  e/o  $\text{IFN}\gamma$ , abbiamo quindi valutato la secrezione delle chemochine IP-10, MIG e fractalkina e delle citochine IL-6 e IL-8 e l'espressione proteica delle molecole VCAM-1 e ICAM-1. Abbiamo poi analizzato i possibili meccanismi sottostanti l'azione sinergica osservata tra  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  sulla secrezione citochinica/chemochinica.

Il secondo obiettivo è stato quello di indagare la potenziale azione anti-infiammatoria del RGZ andando a valutare i suoi effetti sulle sopracitate secrezioni citochiniche ed espressione proteica, indotte da  $\text{TNF}\alpha$  e/o  $\text{IFN}\gamma$ .

Ci siamo inoltre interessati ai meccanismi molecolari alla base degli effetti anti-infiammatori del RGZ andando a studiare sia le classiche vie di segnalazione intracellulare attivate da  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$ , rispettivamente quella di  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  e  $\text{STAT-1}$ , sia la via di  $\text{ERK1/2}$  che non solo si è rivelata coinvolta nel mediare gli effetti infiammatori di  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  ma è anche risultata essere inibita dal RGZ.

Infine, abbiamo studiato il potenziale coinvolgimento del recettore  $\text{PPAR}\gamma$  nel mediare l'azione inibitoria del RGZ, in particolare sulla secrezione di IP-10, sia attraverso l'uso di diversi agonisti e antagonisti, sia mediante il silenziamento genico del recettore stesso.

## Materiali e metodi

### 2.1 Reagenti

Le citochine ricombinanti umane TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , i kit ELISA per il dosaggio di IP-10, Mig e IL-8 sono della R&D System, il kit ELISA per l'IL-6 è della Biosource.

Rosiglitazone, pioglitazone e GW1929 sono della Alexis Biochemicals, il Ciglitazone e il GW9662 sono della Sigma, il BADGE (Bisphenol A Diglycidyl Ether) è della Fluka.

Gli inibitori di MEK1, U0126 e PD98059, sono della Calbiochem.

Gli anticorpi diretti contro le proteine pSTAT-1 (Y701), pI $\kappa$ B (S32/36), pERK1/2 (T202/Y204), Akt sono della Cell Signaling Technology; quelli contro le proteine STAT-1, ERK1/2, I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B, VCAM-1, ICAM-1 RhoA e actina provengono dalla Santa Cruz Biotechnology, l'anticorpo diretto contro la fractalkina è della R&D System.

Nell'analisi FACS, l'anticorpo monoclonale (mAb) coniugato con ficoeritrina (PE) diretto contro il marcatore CD119 (IFNR) e gli mAbs di controllo isotipico sono della BD Biosciences mentre l'anticorpo PE-coniugato anti TNF-R2 è della R&D Systems.

Il siero di capra e l'anticorpo secondario anti-*rabbit* FITC (Fluoresceina-5-Isoiocianato)- coniugato usati per l'analisi immunocitochimica sono della Sigma-Aldrich.

Il materiale plastico sterile monouso è della Corning, i supplementi ed i mezzi per coltura cellulare ed i reagenti per la tecniche di elettroforesi e Western blot sono della Sigma-Aldrich se non diversamente specificato.

## **2.2 Colture cellulari**

Tutti gli esperimenti sono stati condotti con la linea cellulare HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells) gentilmente fornita da E. Ades, F.J. Candal (Centers for Disease Control, Atlanta, GA) e T. Lawley (Emory University).

Le cellule HMEC-1 sono state coltivate in terreno MCDB-131 (GIBCO Life Technologies) supplementato con siero fetale bovino (FBS, Celbio) al 10%, idrocortisone 1 µg/ml, EGF 10 µg/l, penicillina 100 U/ml, streptomicina 100 µg/ml e 2 mM L-glutamine (18). Le cellule sono state cresciute a 37°C in un incubatore ad atmosfera umidificata in presenza di CO<sub>2</sub> al 5%.

## **2.3 Protocollo sperimentale**

Cellule subconfluenti, previamente “affamate” per 24 h in un terreno privo di siero (SF), sono state trattate con i diversi stimoli aggiunti ad un terreno SF contenente BSA (Albumina di Siero Bovino) allo 0.1%.

Il trattamento con rosiglitazone, ciglitazone o pioglitazone (alle dosi indicate nelle rispettive figure) è stato effettuato contemporaneamente allo stimolo infiammatorio con TNFα e/o IFNγ; per il GW1929 (0.1-100 µM), il PD98059 (30 µM), l’U0126 (25 µM), il GW9662 (10 µM) e il BADGE (10µM) è stata invece effettuata una preincubazione di 30’ prima dell’aggiunta delle citochine infiammatorie.

## **2.4 Saggio MTS per la determinazione della vitalità cellulare**

Cellule HMEC-1, cresciute in piastre da 96 pozzetti, sono state sincronizzate 24 h in terreno senza siero e quindi trattate con i rispettivi stimoli (RGZ, BADGE, GW9662) per le successive 24 h. Il numero di cellule in ciascun pozzetto è stato valutato mediante saggio MTS (Promega) secondo le istruzioni della ditta produttrice. La densità ottica (OD) di ciascun campione è stata analizzata alla lunghezza d’onda di 490 nm mediante un lettore di piastre ELISA (Wallac 1420 -

PerkinElmer). Ciascun punto sperimentale è stato eseguito in quintuplicato in almeno tre esperimenti indipendenti.

## ***2.5 Determinazione della concentrazione proteica***

I pellet cellulari ottenuti dopo ciascun trattamento sono stati sottoposti a lisi: 20' in ghiaccio, con specifico tampone di estrazione [20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF (Phenyl-Methyl-Sulphonyl Fluoride)]. La determinazione del contenuto proteico totale dei lisati cellulari è stata effettuata con il metodo di Bradford (147) che utilizza come reattivo il Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad protein assay). Brevemente, il reattivo, in soluzione acida, varia il proprio massimo di assorbimento a seconda che si trovi in forma libera (massimi di assorbimento a 470 e 650 nm) o legato alle proteine (massimo di assorbimento a 595 nm). Dalla lettura spettrofotometrica (alla lunghezza d'onda di 595 nm) dei valori di assorbimento dei campioni è possibile risalire alla concentrazione proteica degli stessi tramite interpolazione su di una curva standard allestita con concentrazioni note crescenti di BSA.

## ***2.6 Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide (SDS-page)***

La separazione proteica dei lisati cellulari è stata eseguita mediante elettroforesi SDS-PAGE (Sodio Dodecil Solfato - PoliAcrilammide Gel Elettroforesi) secondo la metodica di Laemmli (148). Brevemente, tra due lastre di vetro separate da spaziatori sono stati colati e fatti polimerizzare consecutivamente due diversi gel, il “separating gel” e lo “stacking gel” contenenti rispettivamente acrilammide al 10% e al 4%.

Aliquote di 30 µg di proteine, risospese in S.B. 1X (Sample Buffer: 12,5% Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 10% glicerolo 2% SDS, 5% ditiotreitolo, 0.00125% Blu di bromofenolo), sono state bollite per 5' e poi caricate su di un gel riducente al 10% assieme a standard di pesi molecolari (Fermentas). La corsa elettroforetica è



stata eseguita in un opportuno tampone di corsa (3.02 g/l Tris-HCl, 14.4 g/l glicina, 1 g/litro SDS) secondo i seguenti parametri: 1h, 300 V, 50 mA.

## 2.7 *Analisi Western blot*

Terminata la corsa elettroforetica le proteine sono state sottoposte a elettrotrasferimento su membrana di nitrocellulosa Optitran (Schleicher & Schuell). Il trasferimento è stato effettuato in un opportuno tampone refrigerato (10% metanolo, 192 mM glicina, 25 mM Tris) secondo i seguenti parametri: 2 h, 100 V, 350 mA. Dopo il trasferimento, i siti non specifici delle membrane sono stati bloccati mediante incubazione con una soluzione al 5% di latte scremato in TTBS (0.1% Tween-20, 20 mM Tris, 150 mM NaCl) per 1h a temperatura ambiente (*RT*). Le membrane sono state poi incubate a 4°C con gli anticorpi primari, ciascuno ad un'appropriata diluizione, sino al giorno successivo. Dopo 2 lavaggi di 15' in TTBS le membrane sono state incubate 2 h con gli specifici anticorpi secondari (anti-*mouse*, anti-*rabbit*, o anti-*goat*) coniugati con la perossidasi di rafano, alla diluizione 1:3000 v/v. Dopo 2 lavaggi di 15' le membrane sono state incubate 1' con il substrato "BM-enhanced chemiluminescence system" (Roche Diagnostics) ed il segnale di chemiluminescenza acquisito con lo strumento ChemiDoc XRS instrument (BIO-RAD Labs). L'analisi densitometrica delle bande è stata effettuata con il programma Quantity One.

Ciascuna immagine Wester blot mostrata è rappresentativa di una serie derivante da almeno 3 esperimenti indipendenti.

Per verificare l'egual caricamento proteico di ogni pozzetto le membrane sono state normalizzate: dopo procedura di "stripping" con una specifica soluzione (Pierce), le membrane, come specificato in ogni figura, sono state reincubate con un nuovo anticorpo primario diretto o contro la forma non fosforilata della proteina in esame o contro una proteina "housekeeping" ubiquitaria.

## 2.8 Immunocitochimica

Su vetrini portaoggetto, alloggiati in piastre a 6 pozzetti, sono state piastrate  $4 \times 10^4$  cellule. Dopo 48 h di adesione-crescita in terreno completo e 24 h in terreno SF, le cellule sono state trattate con i rispettivi stimoli. Le cellule sono state poi permeabilizzate e fissate incubando i vetrini 5' con una soluzione di paraformaldeide (PF) al 4% e Triton X-100 allo 0.2% poi per altri 10' con la soluzione di sola PF al 4%. I vetrini sono stati lavati in PBS (Phosphate Buffered Saline, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.4 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.3 mM, pH 7.4), incubati 30' a RT con una soluzione bloccante, costituita da siero di capra al 5% in PBS, e poi incubati 3 h con i rispettivi anticorpi primari: anti-NF- $\kappa$ B o anti-pSTAT-1 diluiti 1:50 in siero di capra al 5%. Dopo tre lavaggi seriali in PBS i vetrini sono stati incubati 2 h a RT con l'anticorpo secondario anti-rabbit FITC (diluizione 1:100 v/v in PBS). I vetrini, dopo ulteriori tre lavaggi in PBS, sono stati montati su vetrini portaoggetto con una goccia di soluzione "antifading" (PBS-glicerolo 9:1) e infine sigillati ai bordi con dello smalto.

Le immagini di immunofluorescenza sono state acquisite al microscopio ad epifluorescenza modello Leica DM4000 (Leica Microsystems GmbH).

I controlli negativi (non mostrati) sono stati preparati secondo la procedura descritta escludendo però la fase di incubazione con l'anticorpo primario.

## 2.9 Microscopia confocale a immunofluorescenza

Su vetrini portaoggetto, alloggiati in piastre a 24 pozzetti, sono state piastrate  $10^4$  cellule. Dopo 48 h di adesione-crescita in terreno completo e 24 h in terreno SF, le cellule sono state trattate con i rispettivi stimoli. Le cellule sono state poi permeabilizzate e fissate incubando i vetrini 5' con una soluzione di paraformaldeide (PF) al 4% e Triton X-100 allo 0.2% poi per altri 10' con la soluzione di sola PF al 4%. I vetrini sono stati lavati in PBS, incubati 30' a RT con una soluzione bloccante, costituita da siero di capra al 10% (Vector Laboratories), e poi incubati a 4°C fino al giorno successivo con l'anticorpo anti-

pERK1/2 (diluizione 1:100 v/v). Dopo due lavaggi in TTBS i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo anti-*mouse*-Alexa 488 coniugato (diluizione 1:400 v/v, Molecular Probes). Nel caso di Fig. 15 è stata inoltre effettuata una controcolorazione dei nuclei con ioduro di propidio (Molecular Probes). I vetrini, lavati in TTBS, sono stati montati su vetrini portaoggetti con la soluzione antifading ProLong (Molecular Probes).

Le immagini sono state acquisite con un microscopio confocale a scansione laser modello Leica TCS-SP2 AOBS (Leica Microsystems). Tutte le immagini sono state acquisite con gli stessi parametri di settaggio strumentale attraverso un obiettivo ad immersione 63x 1.4NA.

L'analisi delle immagini è stata effettuata con il programma Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Le immagini dei piani z (z-stacks), relative all'intero spessore cellulare, sono state acquisite campionando ogni 122 nm. Le proiezioni sull'asse z sono state ottenute dalla somma di ogni piano del data set attraverso il programma Image J mentre le immagini delle sezioni volumetriche sono state realizzate con il programma Volocity x 64 (Perkin Elmer).

## **2.10 Analisi citofluorimetrica**

Al termine degli stimoli in piastra, le cellule sono state staccate con EDTA 20 mM e contate in una camera emocitometrica; aliquote corrispondenti a  $10^6$  cellule per campione sono state centrifugate a 1300 RPM per rimuovere l'EDTA ed i pellet risospesi in 1ml di PBS.  $10^6$  cellule per campione sono state incubate 20' a RT con anticorpi PE-coniugati anti-IFN $\gamma$  e anti-TNF-R2 e successivamente analizzate ad un citofluorimetro BDLSRII utilizzando il programma Diva (BD Biosciences). Per ciascun campione sono stati acquisiti almeno  $10^4$  eventi. L'area di positività è stata determinata usando un mAb di controllo isotipico (controllo negativo).

## **2.11 Silenziamento genico**

In una piastra a 6 pozzetti, sono state piastrate e fatte crescere in un terreno completo senza antibiotici  $2 \times 10^5$  cellule in modo da ottenere alle successive 24 h una confluenza ideale per la trasfezione, di circa il 50%.

Per il silenziamento genico è stato utilizzato un siRNA specifico per PPAR $\gamma$  (*Silencer Validated ID5636*, Ambion) alla concentrazione di 30 nM e come controllo negativo un siRNA scrambled (*Silencer Negative Control #1*, Ambion) alla medesima concentrazione.

La trasfezione è stata effettuata con la Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen) seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice.

Brevemente, la lipofectamina è stata diluita (1:50 v/v) e lasciata ad incubare 5'a RT nel mezzo Opti-MEM SF. Terminata l'incubazione, ciascun siRNA, diluito anch'esso in Opti-MEM (per ottenere una concentrazione finale effettiva di 30 nM) è stato aggiunto (in rapporto 1:1 v/v) alla lipofectamina e tenuto ad incubare per ulteriori 20'. La miscela siRNA-Lipofectamina2000 è stata poi aggiunta ai pozzetti contenenti terreno completo senza antibiotici, e le cellule incubate a 37°C per 24 h. Terminate le 24 h di incubazione il mezzo è stato rimosso e sostituito con un mezzo SF. Al termine delle 24 h di sincronizzazione le cellule sono state stimulate come descritto nella sezione "*Risultati*".

## **2.12 Trasfezione cellulare con vettori virali ricombinanti**

La linea cellulare HMEC-1 è stata infettata per un periodo di 24 h ad una molteplicità d'infezione (MOI) di 60 rispettivamente con vettori adenovirali ricombinanti esprimenti la forma costitutivamente attiva (AdMEK<sub>CA</sub>) o la forma cataliticamente inattiva (AdMEK<sub>CI</sub>) di MEK1 e con vettori adenovirali di controllo (Ad).

I virus ricombinanti sono stati propagati in cellule embrionarie umane di rene HEK 293 infettate ad un MOI di 5. Dopo 36-48 h dall'infezione le cellule sono state raccolte e le particelle virali rilasciate tramite lisi ottenuta a seguito di 5 cicli

di congelamento /scongelamento. Ciascuna preparazione virale è stata purificata per centrifugazione in gradiente di densità di CsCl, dializzata e conservata a -70°C in una soluzione contenente 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM MgCl<sub>2</sub> e 10% glicerolo. Il titolo virale è stato determinato tramite saggio di formazione di placche di lisi utilizzando le cellule HEK 293. L'efficienza di trasfezione, valutata tramite saggio colorimetrico con la  $\beta$ -galattosidasi, è stata del 90%.

### ***2.13 Determinazione dei livelli di secrezione citochinica mediante ELISA***

Le cellule, cresciute in piastre da 96 pozzetti, sono state stimulate e dopo 24 h i mezzi condizionati raccolti e conservati a -20°C.

I livelli di secrezione delle citochine IL-6 e IL-8 e delle chemochine IP-10 e Mig nei surnatanti cellulari sono stati determinati mediante l'utilizzo di specifici kit ELISA, secondo il protocollo fornito dalla ditta produttrice. La tecnica ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) si basa su un test di tipo immunoenzimatico e permette di effettuare un'analisi di tipo quantitativo dei campioni.

La sensibilità dei test è di 1.67 pg/ml, <0.70 pg/ml, 3.5 pg/ml e 3.84 pg/ml, rispettivamente per IP-10, IL-6, IL-8 e Mig. Ciascun valore di secrezione citochinica/chemochinica è stato normalizzato per i  $\mu$ g di proteine totali, del rispettivo pozzetto, ricavati tramite dosaggio proteico in piastra con il reagente Bradford (Sigma-Aldrich). Ogni punto sperimentale è stato eseguito almeno in quadruplicato ed è stato dosato almeno in doppio.

### ***2.14 Real Time Quantitative RT-PCR***

Al termine delle 24 h di stimolo le cellule sono state lisate con il tampone RLT (Quiagen) complementato con 1% di  $\beta$ -mercaptoetanol. Per l'estrazione dell'RNA totale è stato utilizzato il kit RNeasy Mini reagent (Quiagen) seguendo le indicazioni fornite dal protocollo della ditta produttrice. La quantificazione

dell'RNA totale è stata effettuata misurando l'assorbanza del campione a 260 nm per mezzo dello spettrofotometro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technology).

Per ciascun campione 400 ng di RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando il kit TaqMan RT PCR (Applied Biosystems). La retrotrascrizione (RT) è stata condotta secondo il seguente programma: 25°C 10', 48°C 30', 95°C 3' in un volume finale di 80 µl (500 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 µM di ciascun dNTP, 2.5 µM di random esameri, 0.4 U/µl di inibitore RNasi, 1.25 U/µl di Multiscribe Reverse Transcriptase). La quantificazione dell'espressione genica è stata ottenuta tramite metodica TaqMan<sup>TM</sup>. La quantità di mRNA *target*, normalizzata rispetto a un gene endogeno housekeeping di riferimento (GAPDH), e relativa ad un calibratore (Quantitative PCR human reference total RNA, Stratagene) è stata espressa come  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  utilizzando per la quantificazione il metodo della comparazione dei  $C_t$  dove:

- $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t, \text{campione}} - \Delta C_{t, \text{calibratore}}$
- $\Delta C_{t, \text{campione}}$  è il valore di  $C_t$  di ogni campione normalizzato rispetto al gene endogeno di riferimento e il  $\Delta C_{t, \text{calibratore}}$  è il valore di  $C_t$  del calibratore normalizzato anch'esso per il gene endogeno di riferimento.

Per ciascun campione la reazione di TaqMan PCR è stata effettuata aggiungendo 12.5 ng di cDNA a 10 µl di PCR mix contenente gli specifici primers/sonda (Taqman Gene Expression Assay; Applied Biosystems) e la Universal Master Mix 1x (Applied Biosystem). I campioni sono stati sottoposti a 40 cicli di amplificazione (95°C per 15'' e 60°C per 60'') con lo strumento ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems).

## 2.15 Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il programma SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Per verificare la distribuzione normale dei dati è stato usato il test di Kolmogorov–Smirnov.

In generale le differenze tra gruppi appaiati di dati sono state valutate con il  $\tau$ -test di Student o con il test di Wilcoxon nel caso di variabili con distribuzione non parametrica e non *normale* mentre per l'analisi di confronti multipli è stato eseguito il test ANOVA seguito dal test *post hoc* di Dunnett.

Per analizzare gli effetti delle diverse concentrazioni di RGZ sulla secrezione chemochinica indotta da IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  è stato utilizzato il test ANOVA (One-way analysis of variance) seguito da correzione *post hoc* di Bonferroni per confronti multipli.

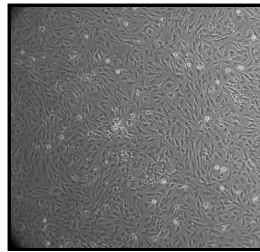
Valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi. I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  SE (standard error) se non diversamente indicato.

I valori di IC<sub>50</sub> (concentrazione con cui si ottiene il 50% del massimo effetto inibitorio la metà della massima risposta inibitoria) sono stati calcolati con il programma ALLFIT (149).

## Risultati

### ***3.1 Azione sinergica di $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ sulla secrezione di IP-10***

L'infiammazione si caratterizza per un'aumentata secrezione di diverse citochine e chemochine la cui funzione è quella di guidare il processo infiammatorio. Dal fine bilanciamento del pannello citochinico/chemochinico deriva la natura del processo infiammatorio stesso. In particolare, durante una risposta infiammatoria di tipo Th1 si ha la concomitante produzione di  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$ , le principali citochine che coordinano le interazioni tra linfociti/macrofagi infiltranti e le cellule residenti nel tessuto. Il modello cellulare scelto per studiare la risposta dell'endotelio vascolare in un contesto infiammatorio Th1 è stato quello delle HMEC-1 (Fig. 1).

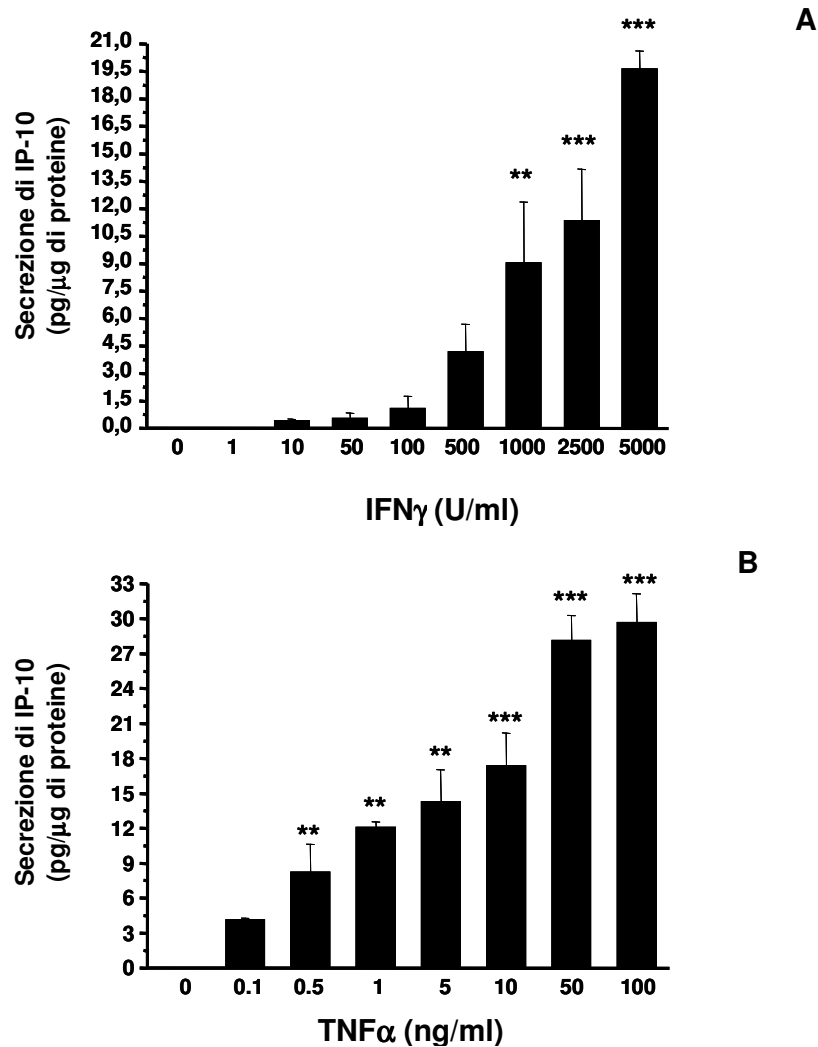


**Fig.1:** Linea cellulare HMEC-1 a confluenza.

Per valutare il contributo relativo delle due citochine alla risposta infiammatoria, abbiamo trattato le HMEC-1 con dosi crescenti di  $IFN\gamma$  o di  $TNF\alpha$ . A 24 h dallo stimolo, abbiamo misurato, nei mezzi di coltura condizionati, i livelli di secrezione di IP-10. Abbiamo osservato che, rispetto ai livelli al limite della rilevabilità delle cellule di controllo, tutte le dosi utilizzate di  $IFN\gamma$  (1-5000 U/ml) o di  $TNF\alpha$  (0,1-100 ng/ml) inducono un significativo aumento, dose dipendente, dei livelli di secrezione di IP-10 (Fig. 2). L'effetto del  $TNF\alpha$  è più marcato rispetto alla corrispondente dose equimolare di  $IFN\gamma$  ed il sistema



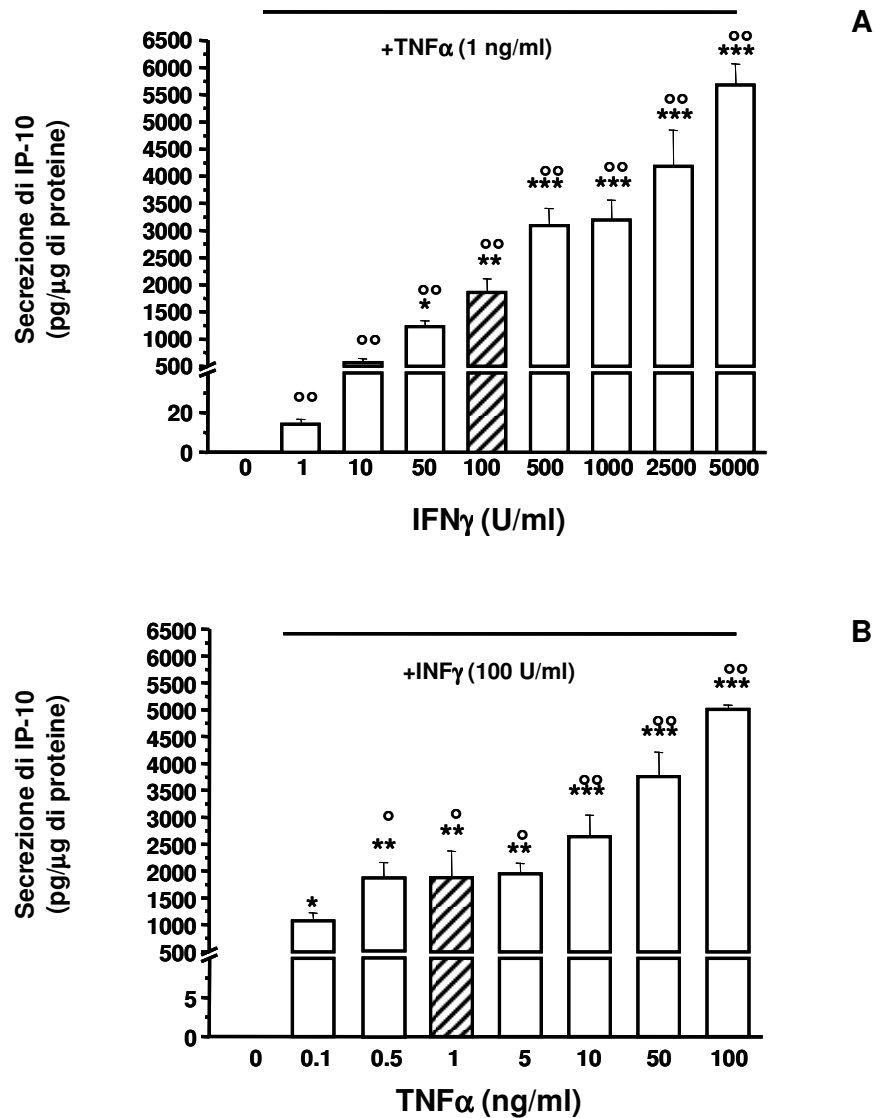
recettoriale sembra saturabile solo per la risposta al  $\text{TNF}\alpha$  (Fig. 2B). Al contrario, la curva dose risposta dell'IP-10, indotta dall' $\text{IFN}\gamma$ , non raggiunge il plateau a nessuna delle dosi utilizzate (Fig. 2A).



**Fig. 2:** Curve dose risposta dell' $\text{IFN}\gamma$  (A) e del  $\text{TNF}\alpha$  (B). Dosi crescenti di  $\text{IFN}\gamma$  (A) o di  $\text{TNF}\alpha$  (B) inducono una secrezione dose-dipendente di IP-10. In cellule di controllo (0) i livelli di IP-10 sono al limite della rilevabilità. \*\* $P < 0.005$  e \*\*\* $P < 0.001$  versus i rispettivi controlli (0).

Nel caso in cui si aggiungano dosi crescenti di  $\text{IFN}\gamma$  (1-5000 U/ml) ad una dose fissa di  $\text{TNF}\alpha$  (1ng/ml) (Fig. 3A) o, viceversa, dosi crescenti di  $\text{TNF}\alpha$  (0,1-

100 ng/ml) ad una dose fissa di IFN $\gamma$  (100 U/ml) (Fig. 3B), si ha un effetto stimolatorio straordinariamente potenziato, con livelli di secrezione di IP-10 più elevati rispetto a quelli indotti dalle singole citochine. Questi risultati suggeriscono che le due citochine abbiano, sulla secrezione di IP-10, un forte effetto sinergico.

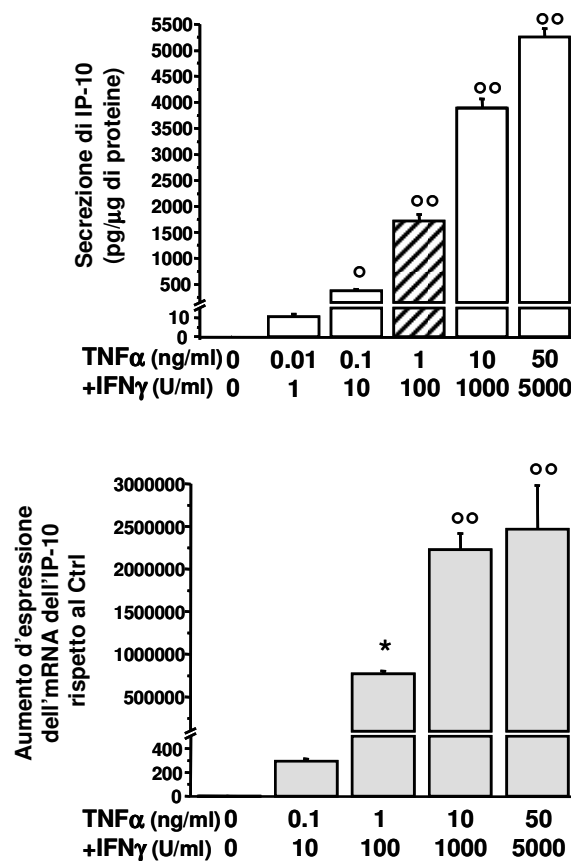


**Fig.3:** IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  hanno un effetto sinergico sulla secrezione di IP-10. Dosi fisse di TNF $\alpha$  (1 ng/ml) (A) o di IFN $\gamma$  (100 U/ml) (B) potenziano la secrezione di IP-10 indotta rispettivamente da dosi crescenti di IFN $\gamma$  (A) e di TNF $\alpha$  (B). (A):\*P<0.05, \*\*P<0.005, \*\*\*P<0.001 versus 0 U/ml IFN $\gamma$ ; °P<0.005,

## Risultati

$^{\circ}P < 0.001$  versus la corrispondente dose di  $\text{IFN}\gamma$  da solo (Fig.2A). (B):  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.005$ ,  $***P < 0.001$  versus 0 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ ;  $^{\circ}P < 0.005$  and  $^{\circ\circ}P < 0.001$  versus la corrispondente dose di  $\text{TNF}\alpha$  da solo (Fig.2B).

La dose combinata che determina il massimo incremento di secrezione di IP-10, rispetto alla secrezione ottenuta con le singole dosi, è quella 1 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ +100 U/ml  $\text{IFN}\gamma$ ; nello specifico la combinata 1 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ +100 U/ml  $\text{IFN}\gamma$  determina, rispetto al solo  $\text{TNF}\alpha$ , un aumento di secrezione di circa 60 volte mentre rispetto al solo  $\text{IFN}\gamma$  un aumento di circa 700 volte. Diverse combinazioni scalari di  $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\gamma$  stimolano in modo esponenziale la produzione di IP-10 sia a livello proteico (Fig. 4A) che a livello di mRNA (Fig. 4B).



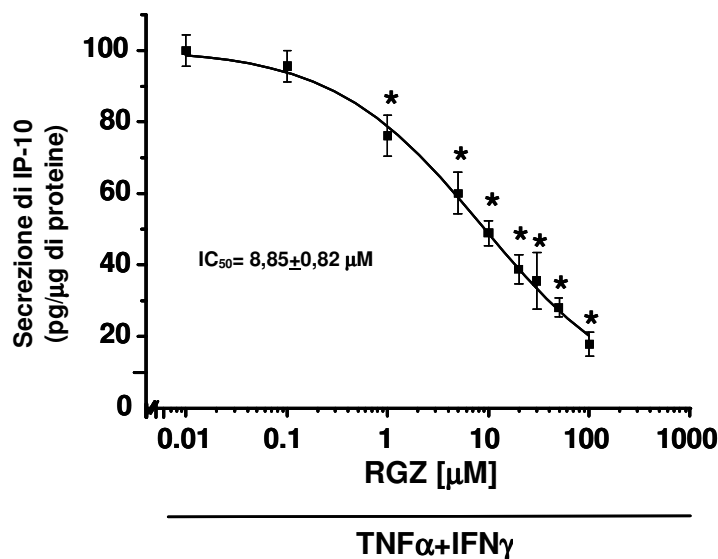
**Fig.4:** Combinazioni scalari di  $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\gamma$  inducono in modo esponenziale la secrezione (A) o l'mRNA (B) dell'IP-10. (A):  $^{\circ}P < 0.001$ ,  $^{\circ\circ}P < 0.001$  versus Ctrl (cellule non stimulate). (B):  $*P < 0.05$ ,  $^{\circ\circ}P < 0.001$  versus Ctrl (considerato 1).

Le concentrazioni utilizzate nei successivi esperimenti, se non diversamente specificato, sono quindi state 1 ng/ml per il TNF $\alpha$  e 100 U/ml per l'IFN $\gamma$ , sia che le due citochine fossero usate singolarmente che in combinazione.

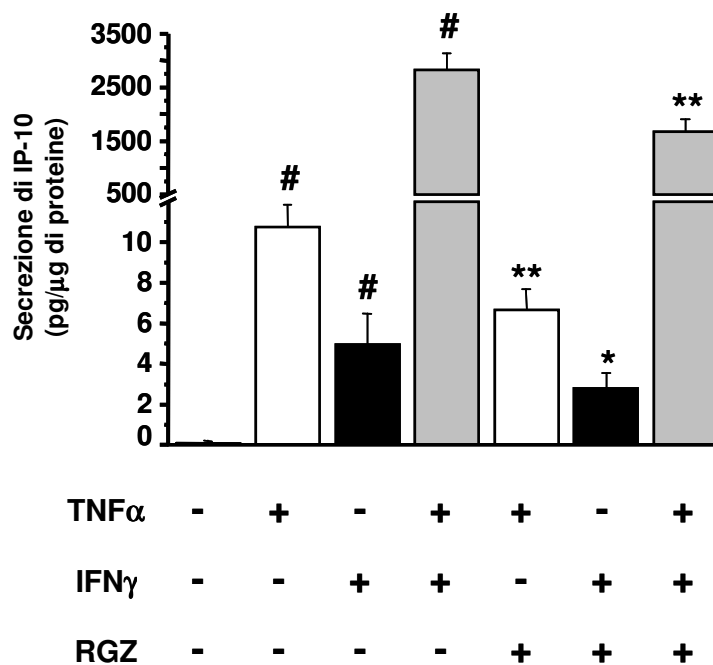
### ***3.2 Azione inibitoria del RGZ sulla secrezione di IP-10 indotta dal TNF $\alpha$ e dall'IFN $\gamma$***

Dal momento che in diversi tipi cellulari il RGZ ha dimostrato avere proprietà anti-infiammatorie (122), abbiamo voluto verificare se nel nostro modello cellulare il RGZ potesse interferire con l'azione infiammatoria di TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Le HMEC-1 sono state quindi trattate per 24 h con 1 ng/ml TNF $\alpha$ +100 U/ml IFN $\gamma$  in presenza di dosi crescenti di RGZ. È stato osservato che il RGZ determina un'inibizione dose dipendente della secrezione di IP-10 con un IC<sub>50</sub> di circa 8,85  $\mu$ M (coefficiente di variazione: 9,3%) in accordo sia con le concentrazioni plasmatiche di RGZ che si raggiungono nel sangue di pazienti in terapia con RGZ, sia con le dosi correntemente usate negli studi *in vitro* (Fig. 5). Mediante saggio di vitalità (MTS) è stata inoltre valutata l'eventuale tossicità del RGZ che però non si è dimostrato tossico a nessuna delle dosi utilizzate (dato non mostrato). La dose di RGZ scelta per il resto degli studi è stata quella di 10  $\mu$ M, se non diversamente specificato.

Per verificare quale fosse l'azione del RGZ sulle singole citochine e se vi fossero differenze rispetto all'azione esercitata sulle citochine usate in combinazione, abbiamo misurato la secrezione di IP-10 a seguito di uno stimolo di 24 h con TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , usati singolarmente o in combinazione, ed in presenza o meno di RGZ. Come si può osservare da Fig. 6, il RGZ inibisce la secrezione di IP-10 indotta da TNF $\alpha$  ed IFN $\gamma$  con una pari efficacia e sia che le due citochine siano usate singolarmente che in combinazione.

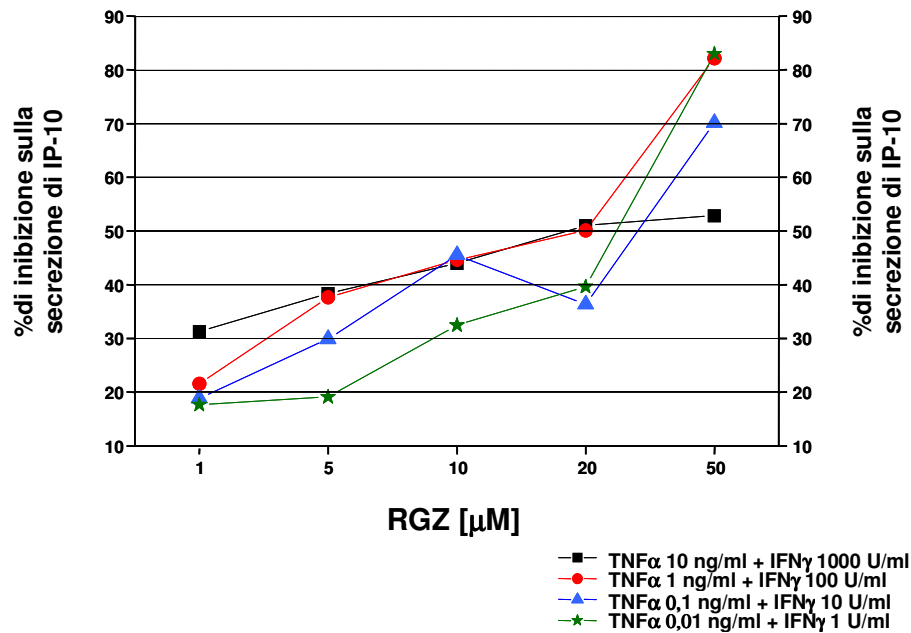


**Fig.5:** Azione inibitoria di diverse dosi di RGZ (da 0 a 100  $\mu M$ ) sulla secrezione di IP-10 a 24 h dallo stimolo con 1ng/ml TNF $\alpha$ +100 U/ml IFN $\gamma$ . Media $\pm$ SE, n=6, \*P<0.001 versus 0  $\mu M$  RGZ.



**Fig.6:** Azione inibitoria del RGZ (10  $\mu M$ ) sulla secrezione di IP-10, a 24 h dallo stimolo con 1 ng/ml TNF $\alpha$  e 100 U/ml IFN $\gamma$  usati da soli o in combinazione. Media $\pm$ SE della secrezione di IP-10, n=11, \*P<0.05, \*\*P<0.001 verso i rispettivi controlli citochinici, #P<0.001 versus Ctrl.

In Fig. 7 è riportata la percentuale di inibizione esercitata da dosi crescenti di RGZ sulla secrezione di IP-10 indotta da quattro diverse combinazioni scalari di  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$ : l'efficacia del RGZ sembra essere indipendente dalle dosi di citochine utilizzate.

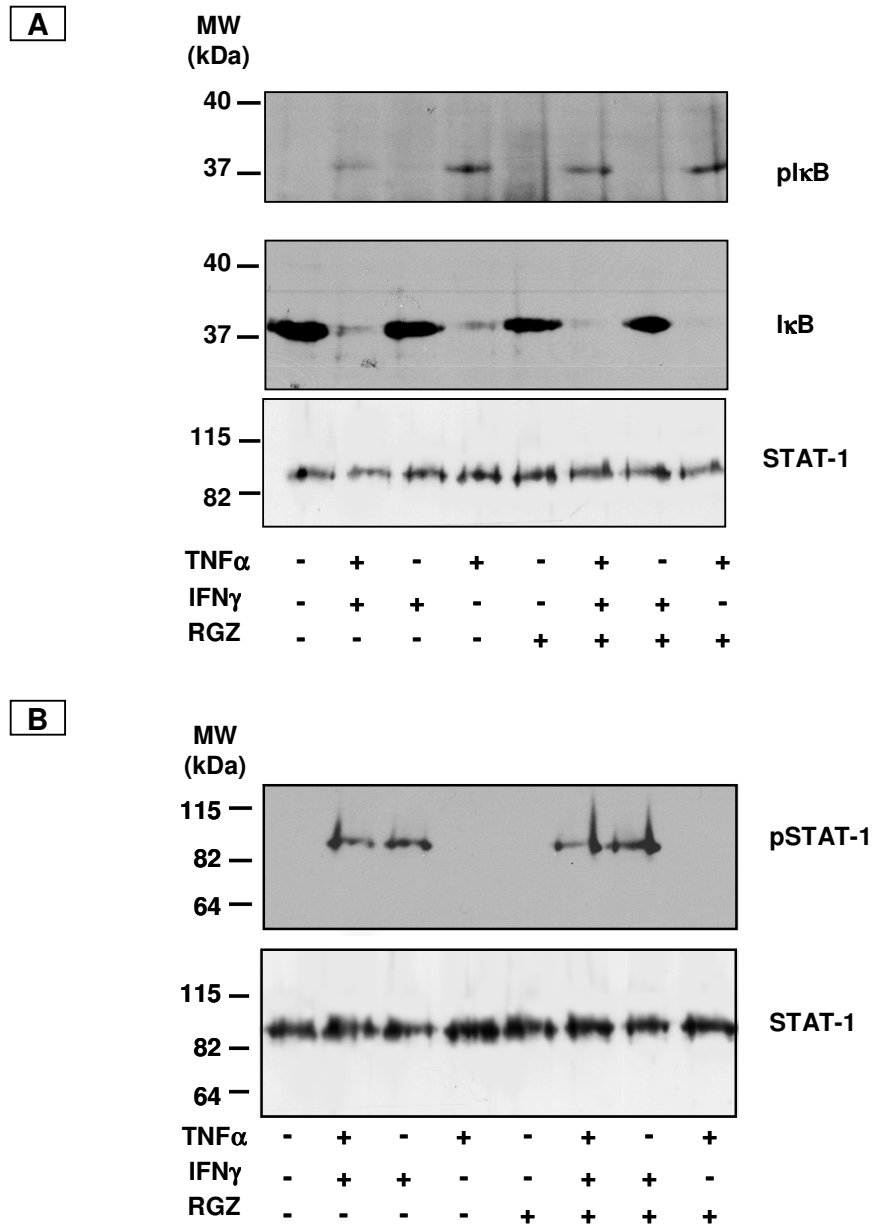


**Fig.7:** Percentuale di inibizione esercitata da dosi crescenti di RGZ sulla secrezione di IP-10 indotta da quattro diverse combinazioni scalari di  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$ .

### 3.3 L'effetto inibitorio del RGZ sulla risposta infiammatoria indotta da $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN}\gamma$ è mediato dall'inibizione di $\text{ERK1/2}$

Per chiarire quale potesse essere la via di segnalazione intracellulare alla base dell'effetto stimolatorio delle citochine  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  sulla secrezione di IP-10, e a quale livello il RGZ esercita il suo effetto inibitorio, abbiamo innanzitutto esaminato le due principali vie note per essere coinvolte nella modulazione degli effetti infiammatori di  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$ , rispettivamente la via di  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  e quella di  $\text{STAT-1}$ . Le HMEC-1 sono state quindi stimulate per 15' con 1 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  e 100 U/ml  $\text{IFN}\gamma$ , usati singolarmente o in combinazione, ed in presenza o meno di

RGZ. Mediante analisi Western blot è stato quindi valutato lo stato di fosforilazione delle proteine IκB (Fig. 8A) e STAT-1 (Fig. 8B).



**Fig.8:** Analisi Western blot di cellule HMEC-1 trattate per 15' con 1 ng/ml TNFα e 100 U/ml IFNγ usati da soli o in combinazione, in presenza o meno di RGZ (10 μM). A: anti-pIκB e dopo stripping anti-IκB e anti-STAT-1. B: anti-pSTAT-1 e dopo stripping anti-STAT-1.

Un modo indiretto per valutare l'attivazione di NF- $\kappa$ B è quello di determinare lo stato di fosforilazione del suo repressore I $\kappa$ B, che quando è fosforilato viene rapidamente ubiquitinato e degradato nel proteasoma. Come atteso, il TNF $\alpha$  e l'IFN $\gamma$ , da soli o in combinazione, inducono la rapida attivazione delle proprie specifiche vie di *signaling*; d'altra parte il RGZ non altera lo stato di fosforilazione né di I $\kappa$ B né di STAT-1 indicando che non è a questo livello che esercita il suo effetto inibitorio (Fig. 8A,B). Da questi esperimenti si può quindi escludere che il RGZ agisca inibendo la rapida attivazione per fosforilazione di NF- $\kappa$ B e di STAT-1, indotta rispettivamente da TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , ma ovviamente questo non vuol dire che il RGZ non possa agire subito a valle dell'evento di fosforilazione, andando ad interferire con l'attività trascrizionale di questi due fattori, meccanismo ben noto e denominato "meccanismo di trans-repressione trascrizionale".

Per escludere che l'inefficacia del RGZ fosse causata dai ridotti tempi di incubazione (i 15' della durata degli stimoli), l'esperimento è stato ripetuto effettuando, prima degli stimoli, un'incubazione di 2 o 24 h con il RGZ: i risultati non sono cambiati rispetto a quelli ottenuti senza preincubazione indicando che l'inefficacia del RGZ non è attribuibile a tempi troppo limitati per poter agire (dati non mostrati).

Per ciascuna analisi Western blot è riportata anche un'appropriata normalizzazione effettuata con anticorpi diretti o contro la forma totale (fosforilata e non) della proteina in esame o contro una proteina housekeeping i cui livelli di espressione non dipendano cioè dal tipo di stimolo effettuato.

Nel caso specifico, è stato utilizzato un anticorpo diretto contro STAT totale per normalizzare sia pSTAT-1 sia pI $\kappa$ B dal momento che I $\kappa$ B totale non può essere rappresentativo di un corretto caricamento proteico a causa dei tempi rapidissimi con cui avviene la degradazione di pI $\kappa$ B.

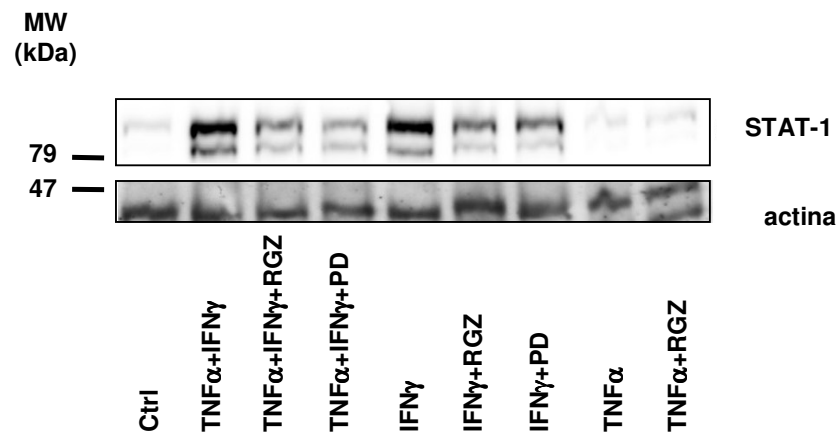
Dal momento che la secrezione di IP-10 è un evento che avviene a tempi (24 h) ben più lunghi di quelli necessari all'attivazione per fosforilazione di STAT-1 e NF- $\kappa$ B (15'), abbiamo indagato se l'azione delle citochine infiammatorie TNF $\alpha$  e



l'IFN $\gamma$  potesse modulare la produzione di IP-10 non solo attraverso processi rapidi che comportano modificazioni post-traduzionali ma anche andando ad influenzare i livelli di espressione di questi fattori trascrizionali. L'analisi Western blot di cellule HMEC-1 trattate per 24 h con le citochine infiammatorie (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ ) ha evidenziato che l'IFN $\gamma$ , da solo o in combinazione con il TNF $\alpha$ , determina un significativo aumento dei livelli di STAT-1 e che il RGZ è capace di inibire questo aumento (Fig. 9).

I livelli di NF- $\kappa$ B, invece, non variano né a seguito dello stimolo con TNF $\alpha$  (da solo o in combinazione) né a seguito dello stimolo con IFN $\gamma$  ed inoltre, non sono influenzati dal RGZ (dato non mostrato).

L'effetto del PD98059 in Fig. 9 può essere spiegato alla luce dei risultati presentati qui di seguito e saranno quindi commentati più avanti.

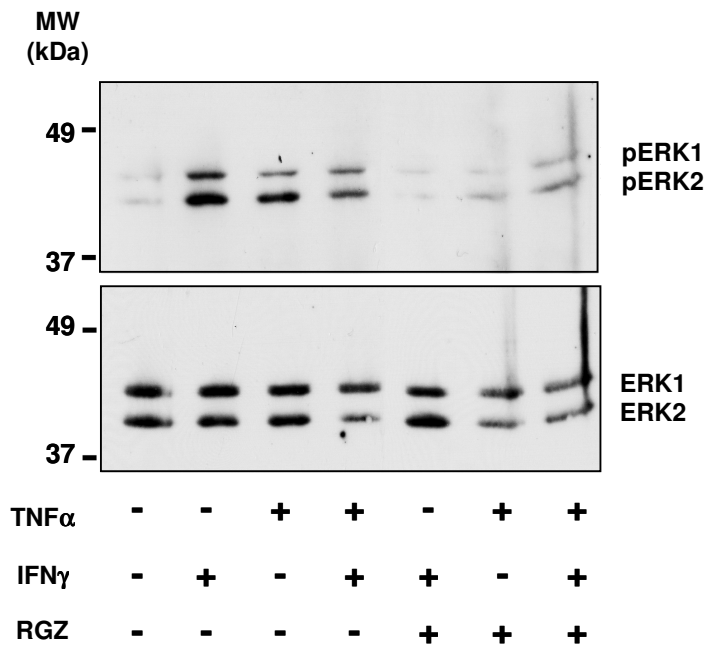


**Fig.9:** Analisi Western blot di cellule HMEC-1 trattate per 24 h con 1 ng/ml TNF $\alpha$  e 100 U/ml IFN $\gamma$  usati da soli o in combinazione, in presenza o meno di RGZ (10  $\mu$ M) e di PD98059 (30  $\mu$ M). Anti-STAT-1 e normalizzazione per l'actina.

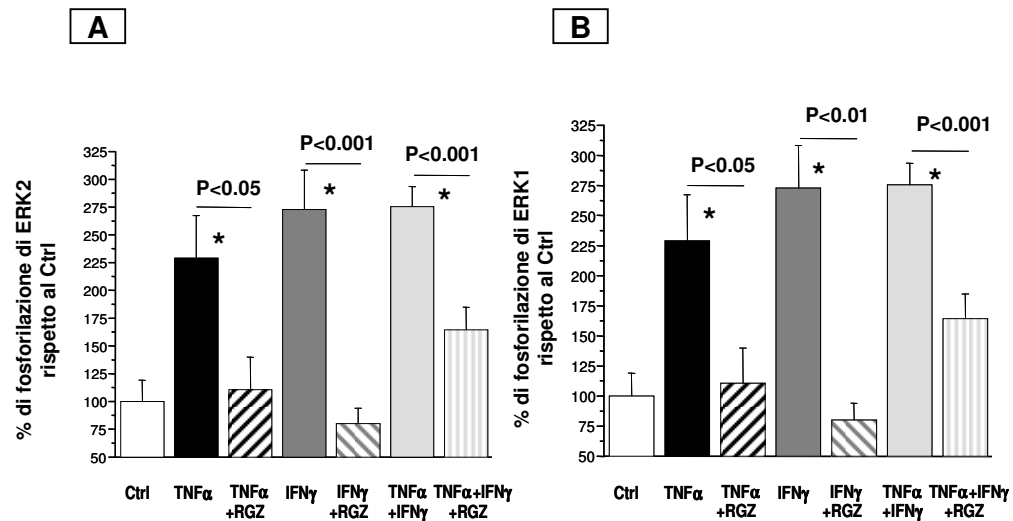
La sintesi di diverse citochine è mediata dall'attivazione di ERK ed in diversi tipi cellulari ERK può mediare alcune delle azioni del TNF $\alpha$ . A partire da queste considerazioni, abbiamo indagato se TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  fossero in grado di stimolare l'attività di ERK attraverso la rapida fosforilazione delle isoforme ERK1 ed

ERK2. In effetti, come mostrato in Fig. 10, uno stimolo rapido (15') con  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$  o  $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\gamma$  determina una fosforilazione/attivazione di ERK1/2 che, in questo caso, viene revertita dalla contemporanea presenza di RGZ.

L'esperimento è stato ripetuto più volte non solo per confermare il dato ma anche per poter eseguire un'analisi di tipo quantitativo dei livelli di fosforilazione di ERK1 ed ERK2. Come mostrato in Fig. 11 A e B, a partire da 12 esperimenti di Western blot, è stata effettuata una valutazione densitometrica dell'intensità delle bande di pERK2 (A) e pERK1 (B). Questa ha evidenziato come l' $\text{IFN}\gamma$  determini una maggiore stimolazione dell'attività di ERK1/2 rispetto a quella indotta dal  $\text{TNF}\alpha$  e come il RGZ inibisca maggiormente la fosforilazione indotta dall' $\text{IFN}\gamma$  rispetto a quella indotta dal  $\text{TNF}\alpha$ . Da notare inoltre che, quando combinati,  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  non agiscono in modo sinergico sulla fosforilazione/attivazione di ERK1/2.

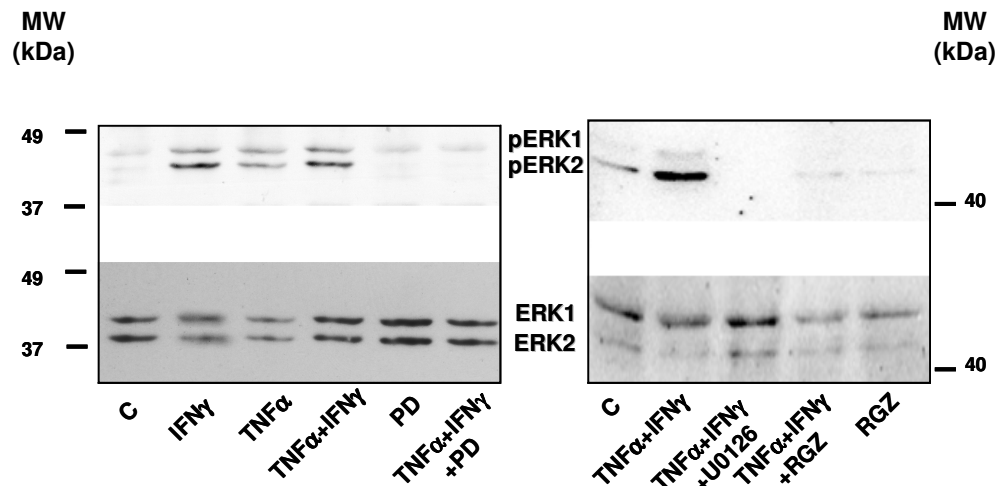


**Fig.10:** Analisi Western blot di cellule HMEC-1 trattate per 15' con 1 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  e 100 U/ml  $\text{IFN}\gamma$  usati da soli o in combinazione, in presenza o meno di RGZ (10  $\mu\text{M}$ ). Anti-pERK1/2 e dopo stripping normalizzazione per ERK1/2.



**Fig.11:** Analisi densitometrica dell'intensità delle bande di pERK2 (A) e pERK1 (B) ottenute da 12 analisi Western blot di cellule HMEC-1 trattate 15' con 1 ng/ml TNFα e 100 U/ml IFNγ usati da soli o in combinazione, in presenza o meno di RGZ (10 μM) (come in Fig. 10). Media percentuale+SE dell'intensità delle bande versus i rispettivi controlli; n=12; \*P<0.001 versus Ctrl.

La capacità del RGZ di inibire l'attivazione di ERK in risposta al TNFα e all'IFNγ è stata ulteriormente confermata comparando gli effetti, sulla fosforilazione di ERK, del RGZ e di due diversi inibitori di MAPK, il PD98059 (30 μM) e l'U0126 (25 μM) (Fig. 12). Entrambi gli inibitori agiscono su MEK1, la chinasi a monte di ERK, e la sua inattivazione determina il blocco di tutta la via di *signaling* di ERK. Tutti e tre i composti hanno inibito la fosforilazione di ERK1/2 ma il RGZ con un'efficacia leggermente inferiore, spiegabile dal fatto che il RGZ, diversamente dagli altri due composti, non è uno specifico inibitore di MAPK.



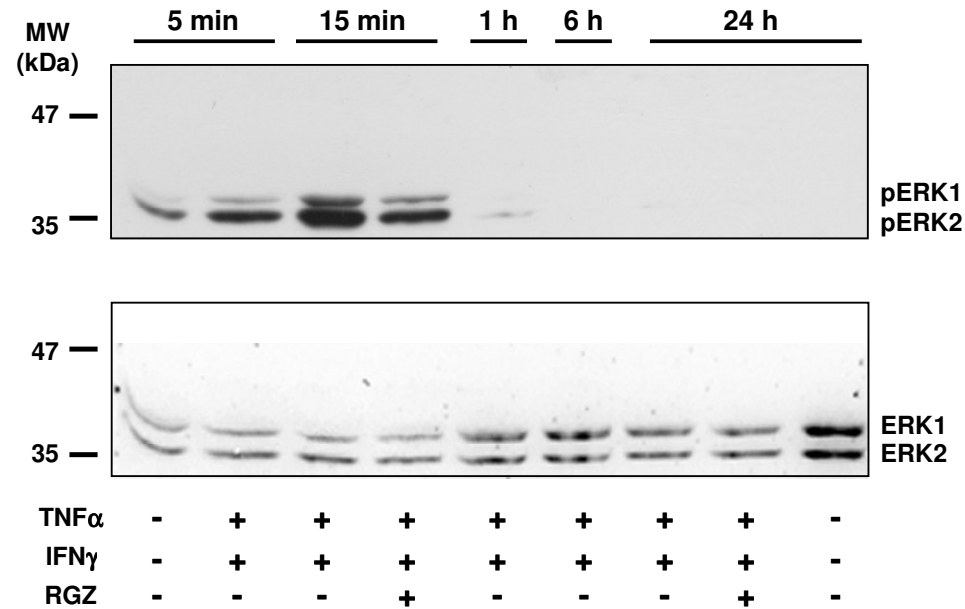
**Fig.12:** Analisi Western blot di cellule HMEC-1 trattate per 15' con 1 ng/ml TNF $\alpha$  e 100 U/ml IFN $\gamma$  usati da soli o in combinazione, in presenza o meno di PD98059 (30  $\mu$ M) (immagine a sinistra) o, in presenza di U0126 (25  $\mu$ M) o RGZ (10  $\mu$ M) (immagine a destra). Anti-pERK1/2 e dopo stripping normalizzazione per ERK1/2.

Tornando un attimo indietro alla Fig. 9, è ora possibile commentare l'azione del PD98059 sull'espressione proteica di STAT-1: il fatto che il PD98059 sia in grado di revertire, similmente al RGZ, l'azione stimolatoria che l'IFN $\gamma$  ha sull'espressione di STAT-1, suggerisce che il meccanismo con cui il RGZ contrasta, a 24 h, l'aumento di STAT-1 avvenga proprio tramite l'inibizione di ERK1/2.

Per verificare se la secrezione di IP-10, fenomeno a lungo termine che si osserva a 24 h dallo stimolo indotto dalle citochine infiammatorie TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , fosse mediata solo dall'attivazione rapida di ERK1/2, osservata a 15', o se piuttosto fosse sostenuta dal perdurare, nel corso delle 24 h, di uno stato fosforilato attivo di ERK è stato allestito un esperimento di tempo dipendenza.

Lo stato di fosforilazione/attivazione di ERK1/2 nel corso del tempo è stato studiato mediante analisi Western blot di lisati cellulari di HMEC-1 trattate per tempi crescenti (5', 15', 1 h, 6 h, 24 h) con TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  in presenza o meno di RGZ (Fig. 13). Dopo soli 5' dallo stimolo infiammatorio ERK1/2 si attiva per poi raggiungere il massimo di attivazione a 15'. Lo stato di fosforilazione di ERK1/2

declina rapidamente già a 1h ed a 6 h ERK1/2 è del tutto inattiva. A 24 h ERK1/2 sembra in parte riacquisire uno stato fosforilato ma il grado di attivazione è minimo soprattutto se confrontato con quello osservato a 15' e non può quindi essere responsabile degli effetti a lungo termine di TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ .

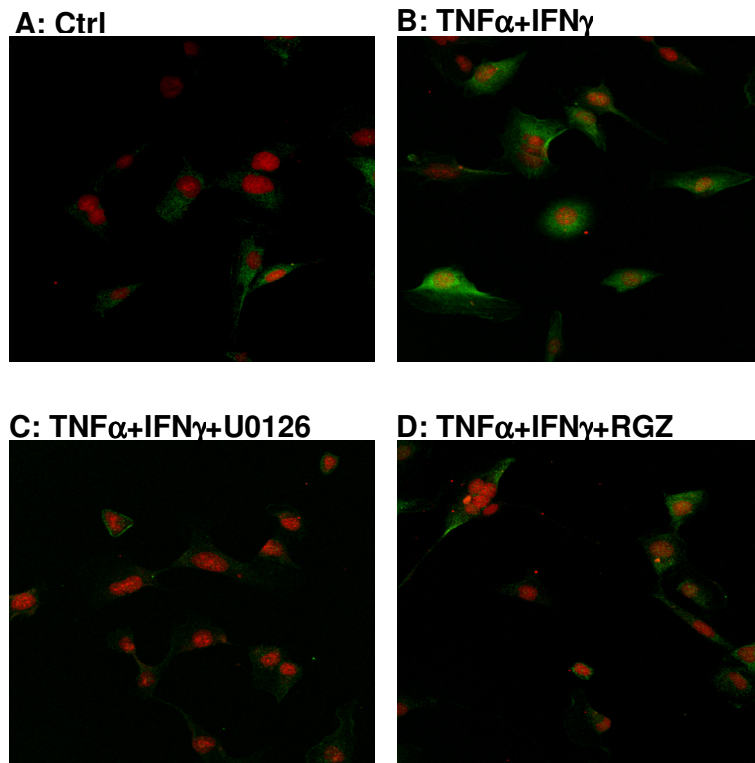


**Fig.13:** Analisi Western blot di cellule HMEC-1 trattate per tempi crescenti (5', 15', 1 h, 6 h, 24 h) con 1 ng/ml TNF $\alpha$ +100 U/ml IFN $\gamma$ , in presenza (a 15' e 24 h) o meno di RGZ (10  $\mu$ M). Anti-pERK1/2 e dopo stripping normalizzazione per ERK1/2.

Abbiamo inoltre valutato se, oltre ad ERK1/2, fossero coinvolte altre chinasi appartenenti alla famiglia delle MAPK, nello specifico p38 e JNK. Nel nostro modello cellulare, queste due chinasi, pur essendo note per mediare alcuni degli effetti del TNF $\alpha$ , non sembrano essere attivate in risposta allo stimolo infiammatorio con TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  né essere influenzate dall'azione del RGZ (dati Western blot non mostrati).

I risultati sull'inibizione di ERK1/2 da parte del RGZ ottenuti con la tecnica di Western blot sono stati ulteriormente confermati con una metodica diversa, la microscopia a confocale. In Fig. 14, l'analisi a immunofluorescenza di cellule

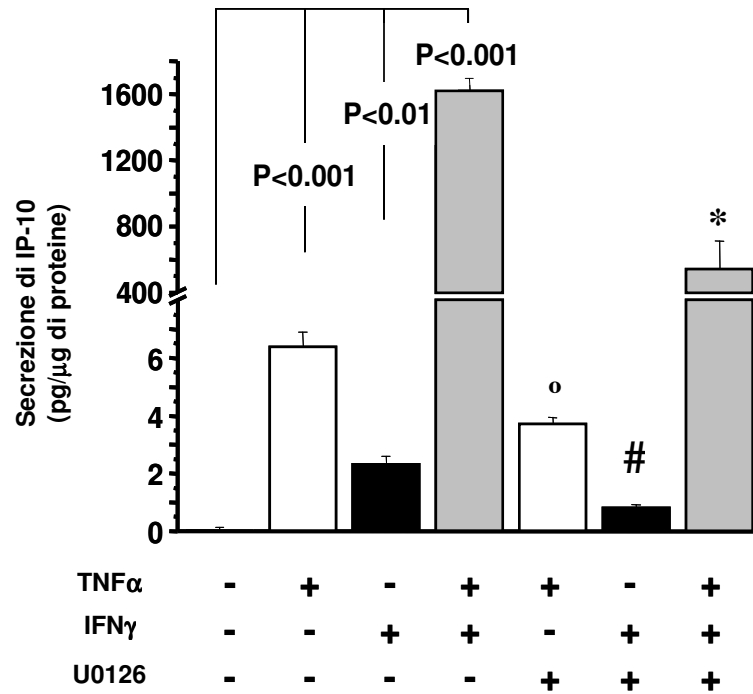
HMEC-1 trattate 15' con  $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\gamma$ , in presenza o meno di U0126 o RGZ, mostra che ERK1/2, a seguito dello stimolo infiammatorio, si fosforila e si localizza sia a livello citoplasmatico sia nel nucleo (B) e che il RGZ (D) inibisce l'attivazione di ERK con un'efficacia simile a quella dell'U0126 (C).



**Fig. 14:** Analisi a immunofluorescenza in microscopia confocale di cellule HMEC-1 trattate 15' con 1 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ +100 U/ml  $\text{IFN}\gamma$  (B), in presenza di U0126 (25  $\mu\text{M}$ ) (C) o di RGZ (10 $\mu\text{M}$ ) (D). (A): controllo, Ctrl. Segnale verde=pERK1/2; segnale rosso=contro-colorazione nucleare con ioduro di propidio.

Per dimostrare che la secrezione di IP-10, indotta dalle citochine infiammatorie  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$ , fosse effettivamente mediata dall'attivazione di ERK1/2, abbiamo allestito un nuovo esperimento a 24 h in cui gli stimoli infiammatori ( $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\gamma$ ) sono stati effettuati in presenza o meno dell'U0126, inibitore di MAPK. L'U0126 si è dimostrato in grado di ridurre

significativamente la secrezione di IP-10 confermando quindi che la via di ERK1/2 è coinvolta nel mediare almeno parte degli effetti che le due citochine infiammatorie hanno sulla secrezione di IP-10 (Fig. 15).

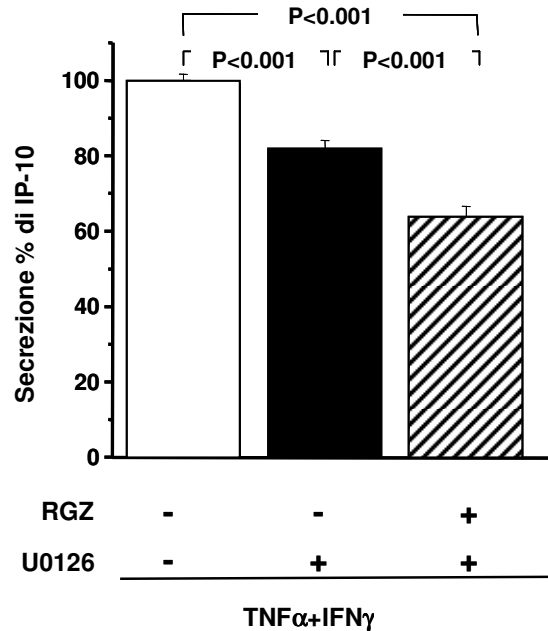


**Fig.15:** Azione inibitoria dell'U0126 (25 μM) sulla secrezione di IP-10, a 24 h dallo stimolo con 1 ng/ml TNFα e 100 U/ml IFNγ usati da soli o in combinazione. La secrezione di IP-10 (media±SE) è stata valutata sui terreni condizionati; n=6, °P<0.01, #P<0.01, \*P<0.001 verso i rispettivi controlli citochinici.

Confrontando i risultati mostrati in Fig. 15 e quelli di Fig. 6 è possibile notare come la specifica inibizione di ERK1/2 da parte dell'U0126 determini una più efficace inibizione della secrezione di IP-10 rispetto a quella ottenuta con il RGZ.

Se il RGZ agisse solo sulla via di ERK1/2, il suo uso in combinazione con l'U0126 non dovrebbe avere un effetto addizionale, ma in realtà, quando combinati, il RGZ e l'U0126 determinano una inibizione della secrezione di IP-10 superiore a quella che inducono quando usati singolarmente (Fig. 16). Questa inibizione addizionale può essere spiegata dal fatto che il RGZ, nonostante converga con l'U0126 sull'inattivazione di ERK, può esercitare il suo effetto

inibitorio anche su altre vie coinvolte nella stimolazione dell'IP-10 quale ad esempio la via di NF- $\kappa$ B (140).

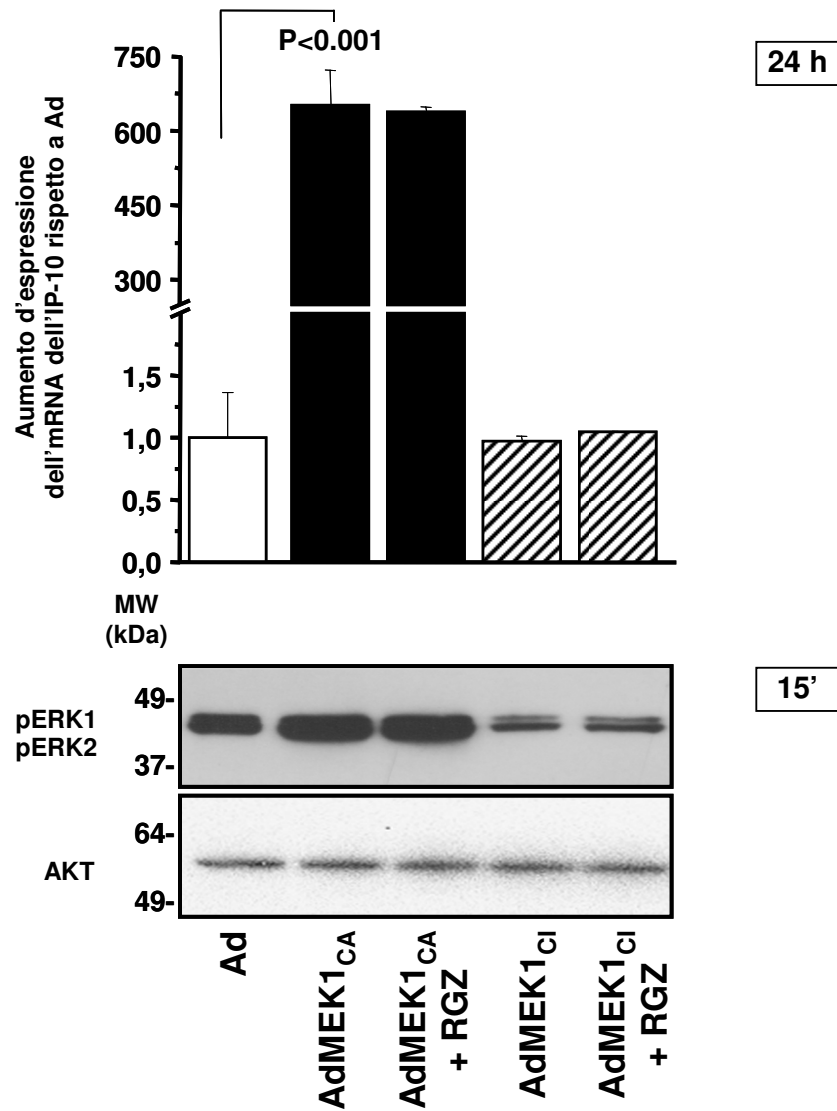


**Fig.16:** Valutazione della secrezione di IP-10 (media percentuale $\pm$ SE, rispetto a TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ ) a 24 h dal trattamento con 1 ng/ml TNF $\alpha$ +100 U/ml IFN $\gamma$  in presenza o meno di RGZ (10  $\mu$ M) e in presenza di RGZ (10  $\mu$ M)+U0126 (25  $\mu$ M); n=3.

Per dimostrare ulteriormente lo specifico coinvolgimento di ERK nella via che porta alla secrezione di IP-10, siamo andati a valutare l'espressione di IP-10 in cellule HMEC-1 non trattate con lo stimolo TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  ma trasdotte con un costrutto per la forma costitutivamente attiva di MEK1 (AdMEK1<sub>CA</sub>) o per la forma cataliticamente inattiva di MEK (AdMEK1<sub>CI</sub>) (Fig. 17). Il fatto che, anche in assenza di stimolo infiammatorio, ERK, resa costitutivamente attiva dal costrutto dominante positivo di MEK1, induca un aumento di espressione dell'mRNA dell'IP-10 ci indica come ERK sia profondamente coinvolta nel mediarne la produzione. Il RGZ non è in grado di revertire l'espressione di IP-10 indotta a 24 h da ERK costitutivamente attiva dal momento che non può revertirne lo stato di fosforilazione/attivazione come è anche confermato dall'analisi

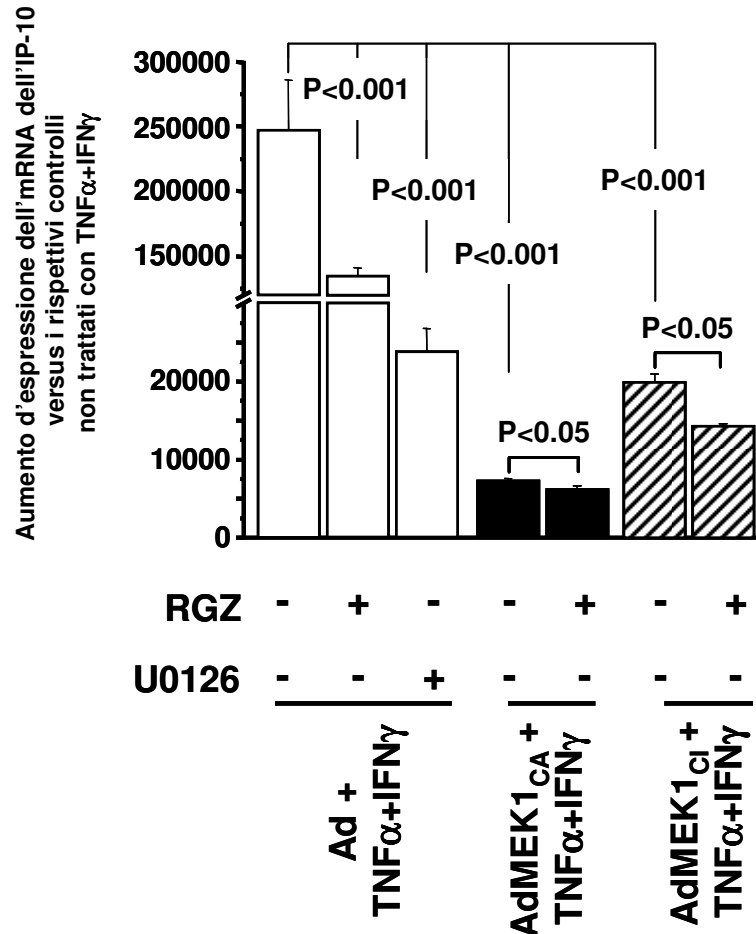


Western blot (Fig. 15): nelle cellule trasdotte con AdMEK1<sub>CA</sub>, 15' di trattamento con RGZ non inducono un'inibizione di ERK dal momento che ERK è resa costitutivamente attiva, quindi "non-inattivabile".



**Fig.17:** Valutazione dell'espressione genica dell'IP-10, con metodica TaqMan, in cellule HMEC-1 a 24 h dalla trasduzione con un costrutto adenovirale di controllo (Ad) o con costrutti adenovirali per le forma costitutivamente attiva (AdMEK1<sub>CA</sub>) o inattiva (AdMEK1<sub>CI</sub>) di MEK1. Media $\pm$ SE dell'mRNA dell'IP-10 rispetto al controllo Ad; n=3. In basso, analisi Western blot delle cellule trasdotte e trattate o meno con RGZ (10  $\mu$ M) per 15'; anti-pERK1/2 e normalizzazione per AKT.

Comunque, il ruolo chiave di ERK nel mediare la secrezione di IP-10 è emerso soprattutto quando siamo andati a studiare l'effetto dello stimolo infiammatorio  $TNF\alpha+IFN\gamma$  sull'espressione di IP-10 in cellule trasdotte con il dominante costitutivamente attivo o cataliticamente inattivo di MEK1 (Fig. 18).



**Fig. 18:** Valutazione dell'espressione genica dell'IP-10, con metodica TaqMan, in cellule HMEC-1 trasdotte con un costrutto adenovirale di controllo (Ad) o con costrutti adenovirali per le forma costitutivamente attiva (AdMEK1<sub>CA</sub>) o inattiva (AdMEK1<sub>CI</sub>) di MEK1 e trattate 24 h con  $TNF\alpha+IFN\gamma$  in presenza o meno di RGZ (10  $\mu$ M) o di U0126 (25  $\mu$ M). Media $\pm$ SE dell'mRNA dell'IP-10 versus i rispettivi controlli-non trattati con  $TNF\alpha+IFN\gamma$ ; n=3.

Il confronto tra gli aumenti di espressione di IP-10, ognuno rispetto al proprio controllo non trattato con  $TNF\alpha+IFN\gamma$ , nei tre gruppi di cellule trasdotte (Ad,

AdMEK1<sub>CA</sub>, AdMEK1<sub>CI</sub>) mette in luce la quota di espressione di IP-10 dovuta a vie segnalatorie diverse da quella di ERK.

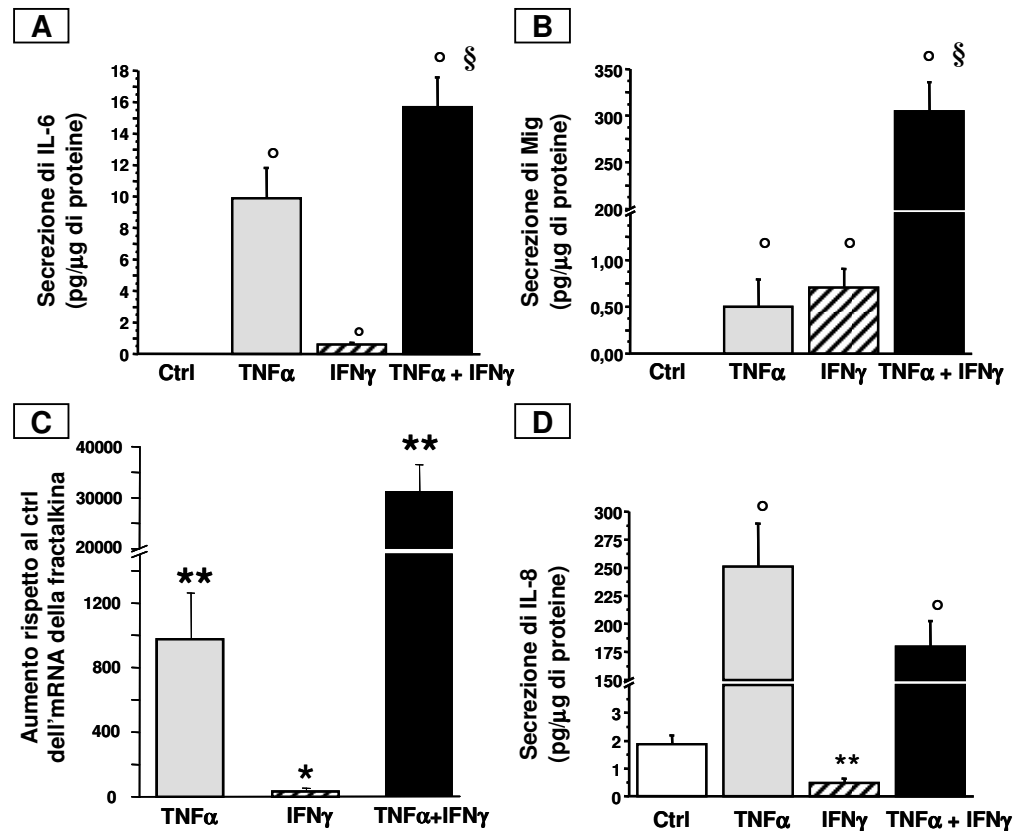
In Fig. 18 sono riportati sulle ascisse i tre gruppi di cellule trasdotte, quello Ad di cellule trasdotte con un costrutto adenovirale di controllo, quello AdMEK1<sub>CA</sub> di cellule trasdotte con il dominante positivo di MEK1 e il gruppo AdMEK1<sub>CI</sub> costituito da cellule trasdotte con il costrutto per MEK1 cataliticamente inattiva.

Sulle ordinate è riportata l'espressione di IP-10 come "fold increase" rispetto ai rispettivi controlli non trattati con le citochine infiammatorie. Nella prima colonna del gruppo AdMEK1<sub>CA</sub>, lo stimolo con TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  non può modulare ulteriormente le due componenti della via di *signaling* di ERK (quella endogena e quella derivante dalla trasduzione) poiché ERK è già attiva, quindi l'espressione di IP-10 che si osserva è quella dovuta alla modulazione, da parte di TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ , di vie di *signaling* alternative, non-ERK, quali ad esempio la via di NF- $\kappa$ B. Un discorso analogo può essere fatto per la prima colonna del gruppo AdMEK1<sub>CI</sub> dove l'inattivazione costitutiva di ERK determina un effetto dominante negativo che spegne la via di *signaling* di ERK; quindi, anche in questo caso, l'espressione di IP-10 indotta da TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  non può che essere dovuta a vie di *signaling* non-ERK. Da notare è come entrambe le prime colonne nei due gruppi trasdotti con AdMEK1<sub>CA</sub> o AdMEK1<sub>CI</sub> siano molto più basse rispetto alla prima colonna del gruppo di controllo Ad che rappresenta l'espressione di IP-10 "totale", dovuta cioè a tutte le possibili vie di *signaling* interessate, anche quella di ERK: questo fatto non fa altro che sottolineare quanto sia rilevante la via di ERK nel mediare la secrezione di IP-10. Nelle cellule trasdotte con il dominante positivo e negativo di MEK1 il RGZ manifesta ancora la sua azione inibitoria sulla secrezione di IP-10 ma non con la stessa efficacia che invece ha nelle cellule di controllo Ad, questo probabilmente perché può agire solo sulle vie non-ERK.

In altre parole, nei gruppi AdMEK1<sub>CA</sub> o AdMEK1<sub>CI</sub> le citochine infiammatorie non possono più modulare ERK e quindi si osserva il loro effetto su altre vie di *signaling* (ad es. NF- $\kappa$ B) e l'azione del RGZ solo su queste.

### 3.4 Il sinergismo tra $TNF\alpha$ ed $IFN\gamma$ non è solo coinvolto nella “up-regulation” dell’IP-10 ma anche di altre citochine/chemochine caratterizzanti la risposta infiammatoria

Per indagare se il sinergismo osservato tra  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$  fosse limitato alla sola regolazione della secrezione di IP-10, o se piuttosto fosse un fenomeno più esteso, abbiamo misurato i livelli di espressione di altre citochine/chemochine caratterizzanti la risposta infiammatoria. In effetti, a seguito del trattamento delle HMEC-1 con  $TNF\alpha$  (1 ng/ml) e  $IFN\gamma$  (100 U/ml), da soli o in combinazione, abbiamo rilevato un aumento di secrezione anche di IL-6 e Mig (Fig. 19 A-B).

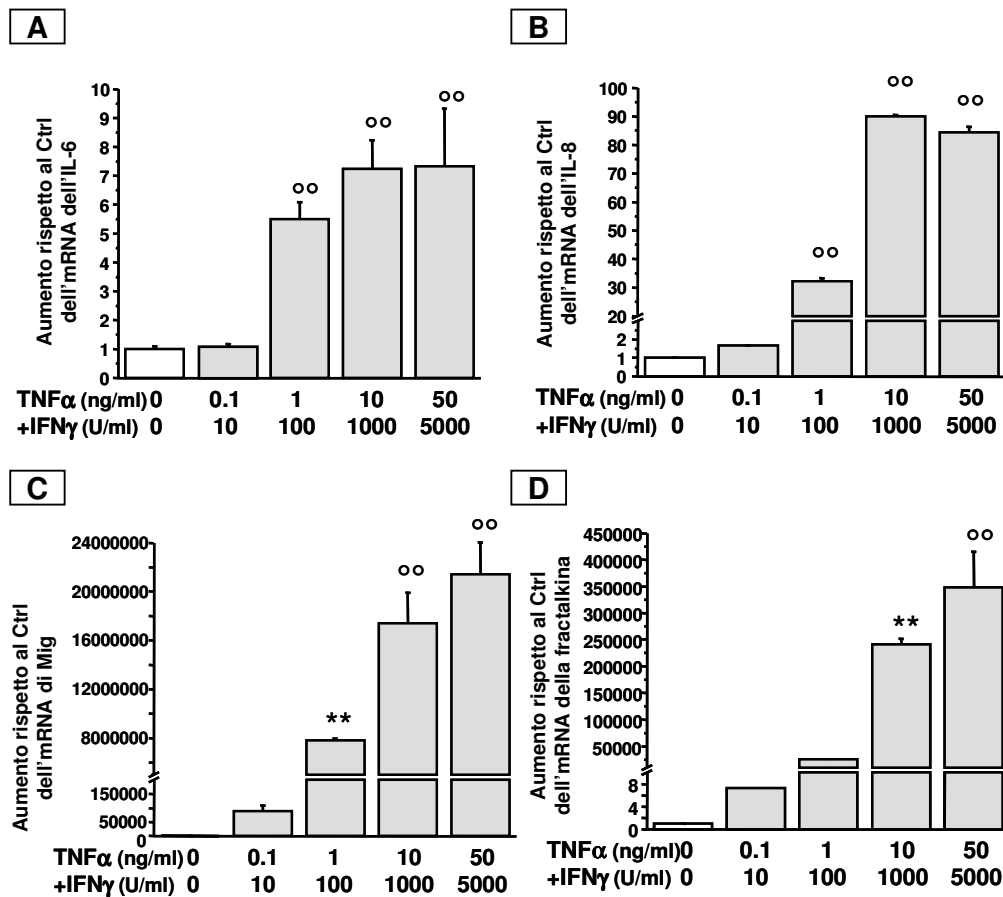


**Fig.19:** Valutazione dei livelli di secrezione di IL-6 (A), Mig (B), IL-8 (D) e dell'espressione della fractalkina (C) a 24 h dal trattamento delle HMEC-1 con 1 ng/ml  $TNF\alpha$  e 100 U/ml  $IFN\gamma$  usati da soli o in combinazione. Media  $\pm$  S.E.M dei valori di secrezione/espressione ottenuti da n=12 esperimenti. In A, B e D: \*\* $P < 0.01$  e ° $P < 0.001$  versus Ctrl, § $P < 0.001$  versus  $TNF\alpha$  o  $IFN\gamma$ . In C: \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.001$  versus Ctrl.

Anche l'espressione della fractalkina, un'altra chemochina di tipo Th1, aumenta in risposta a  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  che, quando combinati, esercitano un marcato effetto sinergico, in modo analogo a quanto osservato per IP-10 e Mig (Fig. 19C).

Da notare che, mentre il  $\text{TNF}\alpha$  stimola la secrezione di IL-8, l' $\text{IFN}\gamma$  esercita un effetto inibitorio sia sui livelli di secrezione basale di IL-8 sia sui livelli di secrezione indotti dal  $\text{TNF}\alpha$  (Fig. 19D).

Abbiamo inoltre osservato che diverse combinazioni scalari di  $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\gamma$  stimolano in modo esponenziale l'espressione di IL-6 (Fig. 20A), IL-8 (Fig. 20B) e delle chemochine di tipo Th1 Mig (Fig. 20C) e fractalkina (Fig. 20D).



**Fig.20:** Valutazione dei livelli di espressione di IL-6 (A), IL-8 (B), Mig (C) e fractalkina (D) a 24 h dal trattamento delle HMEC-1 con 4 diverse combinazioni scalari di  $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\gamma$ . Media $\pm$ S.E.M dell'aumento di espressione citochinica versus l'espressione in cellule di controllo non stimolate; n=3, \*\*P<0.01; °°P<0.001 versus i Ctrl considerati 1.

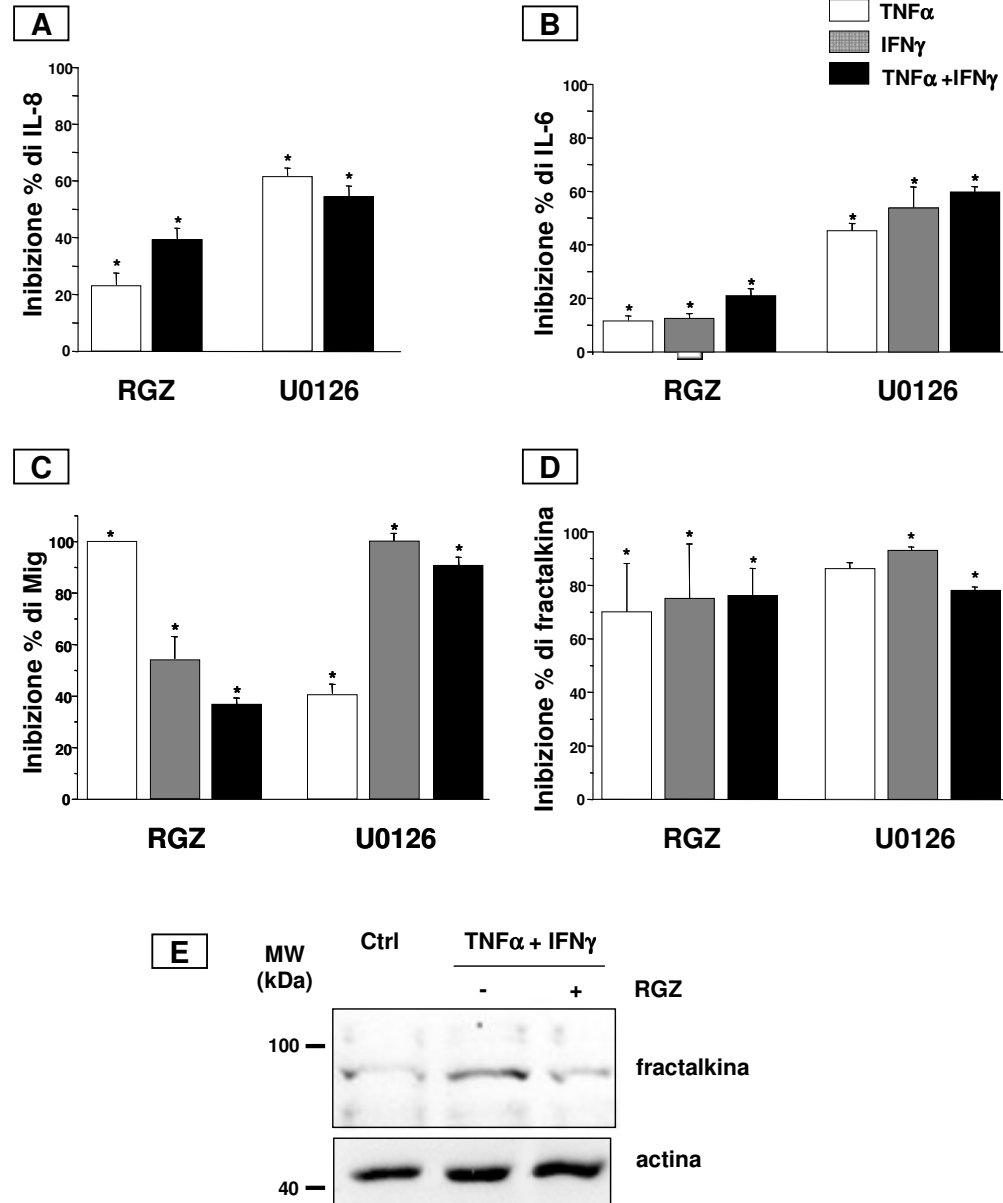
### ***3.5 L'azione anti-infiammatoria del RGZ non è limitata all'inibizione dell'IP-10: effetti su altre citochine/chemochine caratterizzanti la risposta infiammatoria***

Dal momento che abbiamo osservato che il RGZ esercita un'azione anti-infiammatoria sulla secrezione di IP-10 abbiamo voluto indagare se questo effetto si verificasse anche sulla secrezione di altre citochine/chemochine indotte dallo stimolo con TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , da soli o in combinazione. In effetti, la secrezione di IL-8, indotta da TNF $\alpha$  e TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ , è inibita dal RGZ (Fig. 21A). Il RGZ determina un'inibizione della secrezione, indotta da TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ , anche dell'IL-6 (B) e di Mig (C) e un'inibizione dell'espressione della fractalkina (D). In tutti i casi si può osservare che l'efficacia del RGZ è massima sulla secrezione indotta dalle citochine usate in combinazione.

Per la fractalkina, di cui è stato possibile valutare solo l'inibizione dell'espressione dell'mRNA e non direttamente della secrezione, abbiamo voluto confermare il risultato anche a livello proteico mediante tecnica Western blot: utilizzando uno specifico anticorpo diretto contro la fractalkina abbiamo rilevato che, rispetto alle cellule di controllo, nei lisati totali di cellule trattate con TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  vi è un aumento del contenuto in fractalkina e che la contemporanea presenza di RGZ ne determini una marcata diminuzione (E).

Poiché abbiamo già dimostrato che la fosforilazione/attivazione rapida di ERK è coinvolta nel mediare gli effetti di TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  sulla stimolazione della secrezione di IP-10 abbiamo verificato se questo stesso meccanismo non-genomico potesse essere alla base degli effetti che le due citochine hanno sulla secrezione di IL-8, IL-6, Mig e fractalkina. Anche in questo caso, se prima dello stimolo infiammatorio si effettua una preincubazione delle cellule HMEC-1 con l'U0126, inibitore della via di *signaling* di ERK, si ottiene una significativa inibizione della secrezione di IL-8, IL-6, Mig e fractalkina (Fig. 21A-D), a chiara

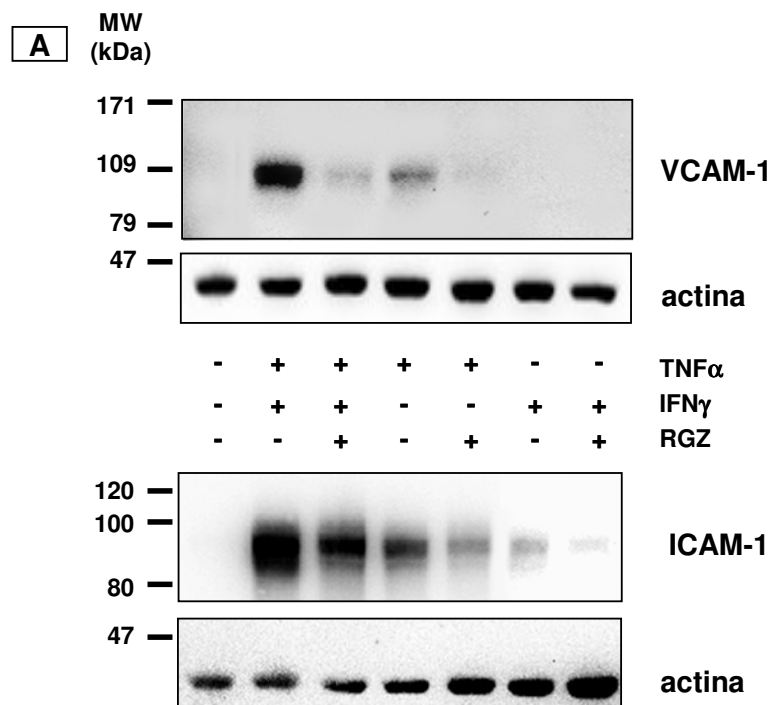
dimostrazione del fatto che ERK sia coinvolta nel mediare gli effetti di  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  sulla secrezione di queste citochine/chemochine.



**Fig.21:** Inibizione percentuale da parte del RGZ (10  $\mu\text{M}$ ) o dell'U0126 (25  $\mu\text{M}$ ) della produzione di IL-8 (A), IL-6 (B), Mig (C) e fractalkina (D) indotte da un trattamento di 24 h con  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$ , usati singolarmente o in combinazione. Media $\pm$ SE, \*P<0.001 versus il rispettivo controllo citochinico. (E): analisi Western blot di cellule HMEC-1 trattate 24 h con  $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\gamma$  in presenza o meno di RGZ (10  $\mu\text{M}$ ); anti-fractalkina e normalizzazione per l'actina.

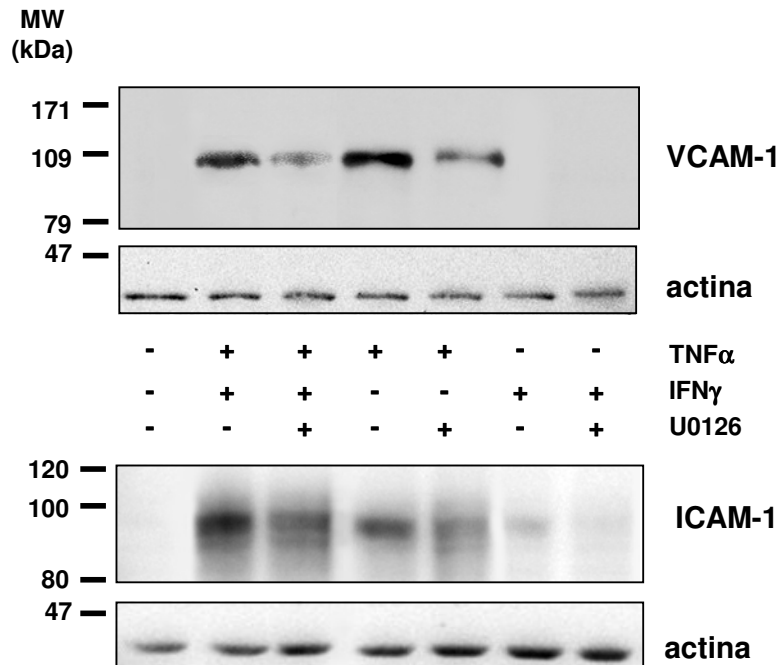
### 3.6 Azione del RGZ sulle molecole di adesione

Il processo infiammatorio determina un massiccio reclutamento dei leucociti che prima sono richiamati dalle chemochine e poi catturati dalle interazioni con le cellule endoteliali (ECs). Sia le chemochine che le molecole di adesione cellulare (CAM), ed in particolare VCAM-1 ed ICAM-1, giocano quindi un ruolo coordinato ed essenziale. Come per le chemochine, l'espressione delle CAM è strettamente influenzata dal milieu citochinico ed è stato già dimostrato che il trattamento *in vitro* delle ECs con  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  induce una up-regolazione delle CAM (150). Mediante analisi Western blot abbiamo quindi indagato se il RGZ potesse influenzare l'espressione di VCAM-1 e ICAM-1. In Fig. 22A è evidente come, in cellule HMEC-1 trattate 24 h con  $\text{TNF}\alpha$  e/o  $\text{IFN}\gamma$  il RGZ determini un'inibizione dell'espressione proteica sia di VCAM-1 che di ICAM-1. Un risultato analogo è stato ottenuto effettuando, prima dello stimolo infiammatorio, una preincubazione con l'inibitore U0126, a chiara dimostrazione dell'importanza dell'attivazione di ERK per la modulazione delle CAM (Fig. 22B).





**B**



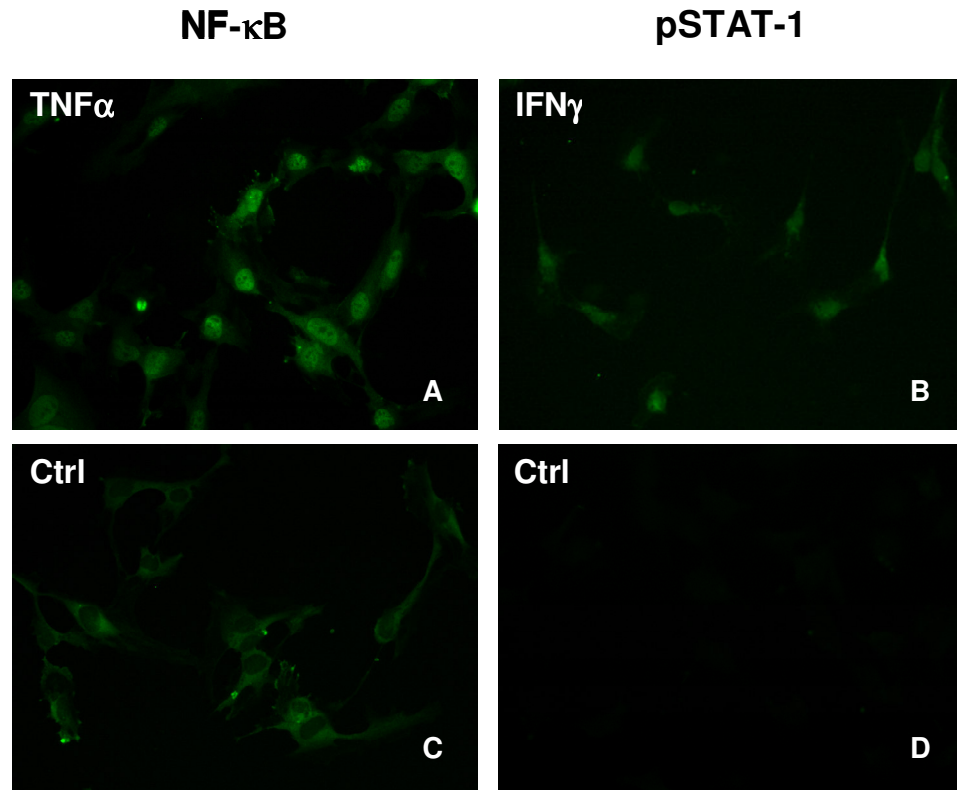
**Fig.22:** Analisi Western blot di cellule HMEC-1 trattate 24 h con 1 ng/ml TNFα e 100 U/ml IFNγ usati da soli o in combinazione, in presenza o meno di RGZ (10 μM) (A) o di U0126 (25μM) (B). (A), (B): anti-VCAM-1, anti-ICAM-1 e normalizzazione per l'actina.

### 3.7 Meccanismi molecolari sottostanti l'azione sinergica di TNFα e IFNγ

Per studiare i meccanismi molecolari responsabili del sinergismo che si verifica tra TNFα e IFNγ sulla secrezione di diverse citochine (IP-10, Mig fractalkina, IL-6), abbiamo innanzitutto preso in considerazione le due principali vie note per mediare gli effetti di TNFα e IFNγ, quella di STAT-1 e di NF-κB.

Avendo già evidenziato, tramite Western blot, che uno stimolo rapido di 15' con TNFα o IFNγ determina rispettivamente l'attivazione di NF-κB e STAT-1 abbiamo voluto indagare, mediante immunofluorescenza, la localizzazione cellulare di questi fattori trascrizionali (Fig. 23). A seguito di uno stimolo rapido (30') con TNFα o IFNγ si verifica la traslocazione nucleare rispettivamente di

NF- $\kappa$ B e di pSTAT-1 (Fig. 23 A-B). Nelle cellule HMEC-1 di controllo (assenza di stimoli), NF- $\kappa$ B presenta una localizzazione citosolica e perinucleare (Fig. 23C) mentre la positività per pSTAT-1 è pressoché nulla (Fig. 23D).



**Fig.23:** Analisi ad immunofluorescenza di cellule HMEC-1 trattate 30' con 1 ng/ml TNF $\alpha$  (A) o 100 U/ml IFN $\gamma$  (B). (A), (C): segnale verde=NF- $\kappa$ B. (B), (D): segnale verde=pSTAT-1. TNF $\alpha$  (A) e IFN $\gamma$  (B) stimolano rispettivamente la traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B e di pSTAT-1. In cellule di controllo non trattate (C, D, Ctrl) NF- $\kappa$ B ha una localizzazione citosolica (C), mentre pSTAT-1 non è presente in quanto si trova nella forma non fosforilata (D).

Inoltre, avendo già dimostrato che TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  inducono la secrezione di IP-10 attivando, oltre alle vie classiche di NF- $\kappa$ B e STAT-1, anche la via di ERK1/2 abbiamo indagato, tramite microscopia a confocale, la localizzazione

intracellulare di pERK1/2 in cellule HMEC-1 stimulate per 15' con TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , da soli o in combinazione (Fig. 24).

Infatti, nonostante la combinazione di TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  abbia un effetto sinergico sulla secrezione di IP-10 e di altre citochine/chemochine, i livelli di fosforilazione/attivazione di ERK1/2 non risultano potenziati dalla combinazione di TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  ed anzi sembrano essere massimi quando l'IFN $\gamma$  è usato da solo (Fig. 10). Per cercare di spiegare questa apparente discrepanza e quindi capire come dalla rapida fosforilazione della stessa chinasi (ERK1/2), indotta da TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  usati in combinazione, possa scaturire una secrezione citochinica/chemochinica enormemente potenziata rispetto a quella ottenuta con TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  usati singolarmente (effetto sinergico a lungo termine), abbiamo studiato la localizzazione intracellulare di ERK1/2 attivata.

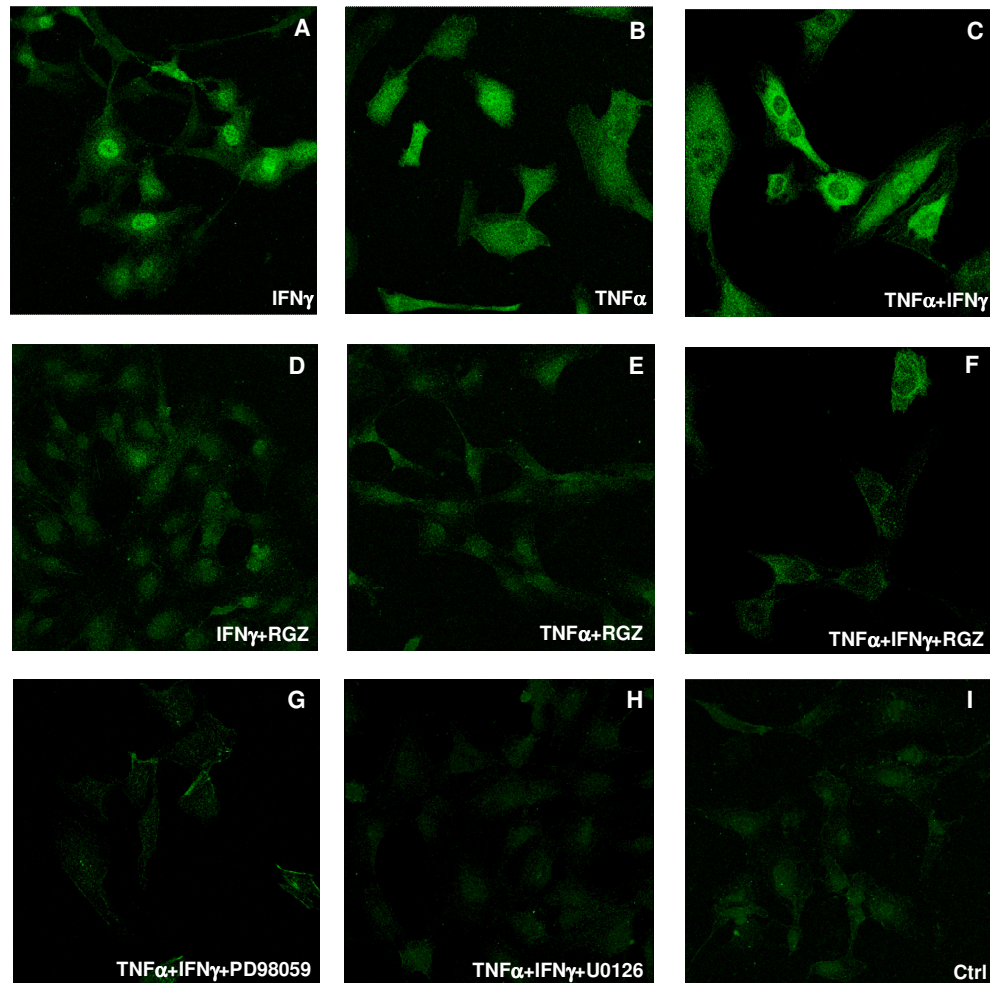
In effetti, sebbene a livello di fosforilazione di ERK1/2 non si osservi alcun sinergismo, l'analisi a immunofluorescenza rivela una diversa localizzazione subcellulare di pERK1/2 in risposta agli stimoli con TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$  (Fig. 24).

L'IFN $\gamma$  induce prevalentemente una traslocazione nucleare di pERK1/2 (Fig. 24A) mentre a seguito dello stimolo con TNF $\alpha$  pERK1/2 appare diffusamente distribuita nella cellula (Fig. 24B). Quando TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  sono combinati si ottiene una positività di segnale per pERK1/2 sia nucleare che extra-nucleare (Fig. 24C). La contemporanea presenza di RGZ determina una significativa inibizione dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 e della sua compartimentalizzazione indotti da IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  (Fig. 24D-F). Il trattamento con gli inibitori di ERK1/2, il PD98059 e l'U0126 (rispettivamente Fig. 24G e H) determina un'inibizione di ERK1/2 anche superiore a quella ottenuta con il RGZ.

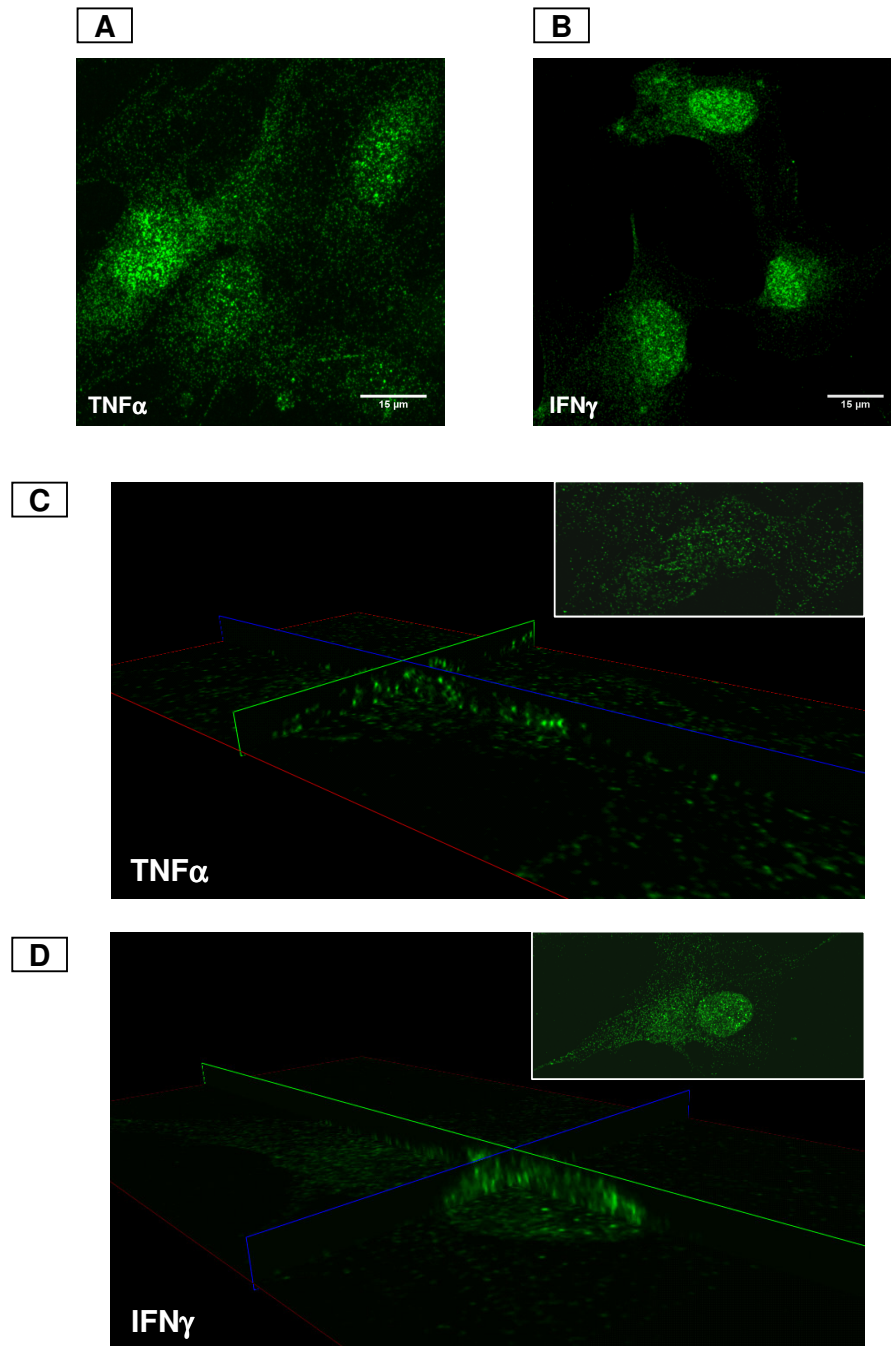
Da una microscopia confocale condotta in modo più dettagliato, attraverso un'analisi tridimensionale del volume cellulare, emerge come pERK1/2, a seguito dello stimolo con TNF $\alpha$ , si localizzi non solo diffusamente nella cellula ma anche specificamente a livello della membrana cellulare (Fig. 25A,C). In Fig. 25 B e D

## Risultati

risulta ancora più evidente come l'IFN $\gamma$  determini un reclutamento di pERK1/2 prevalentemente a livello nucleare.



**Fig.24:** Analisi a immunofluorescenza in microscopia confocale di cellule trattate 15' con 1 ng/ml TNF $\alpha$  e 100 U/ml IFN $\gamma$ , usati singolarmente o in combinazione in presenza o meno di RGZ (10  $\mu$ M), PD98059 (30  $\mu$ M) e U0126 (25  $\mu$ M). Segnale verde: pERK1/2. A seguito del trattamento con IFN $\gamma$  si ha una marcata localizzazione nucleare di pERK1/2 (A) mentre il trattamento con TNF $\alpha$  determina una localizzazione di pERK1/2 più diffusa (B). Il trattamento con TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  determina una localizzazione di pERK1/2 sia nucleare che diffusa nella cellula (C). Sia il RGZ (D-F) che gli inibitori di ERK PD98059 e U0126 (G, H) inibiscono l'attivazione di ERK1/2. (I): cellule di controllo (Ctrl).



**Fig.25:** Analisi confocale della diversa compartimentalizzazione di pERK1/2 a seguito di un trattamento di 15' con 1 ng/ml TNF $\alpha$  (A, C) e 100 U/ml IFN $\gamma$  (B, D). (A), (B): proiezioni sull'asse Z. (C),(D): sezioni volumetriche tridimensionali; nell'inserito vista del piano XY. Il TNF $\alpha$  determina una localizzazione di pERK diffusa nel citosol e associata alla membrana (C) mentre l'IFN $\gamma$  indirizza pERK1/2 nel nucleo (D).

### ***3.8 IFN $\gamma$ e TNF $\alpha$ determinano una reciproca “up-regulation” del TNF-R2 e del IFNR***

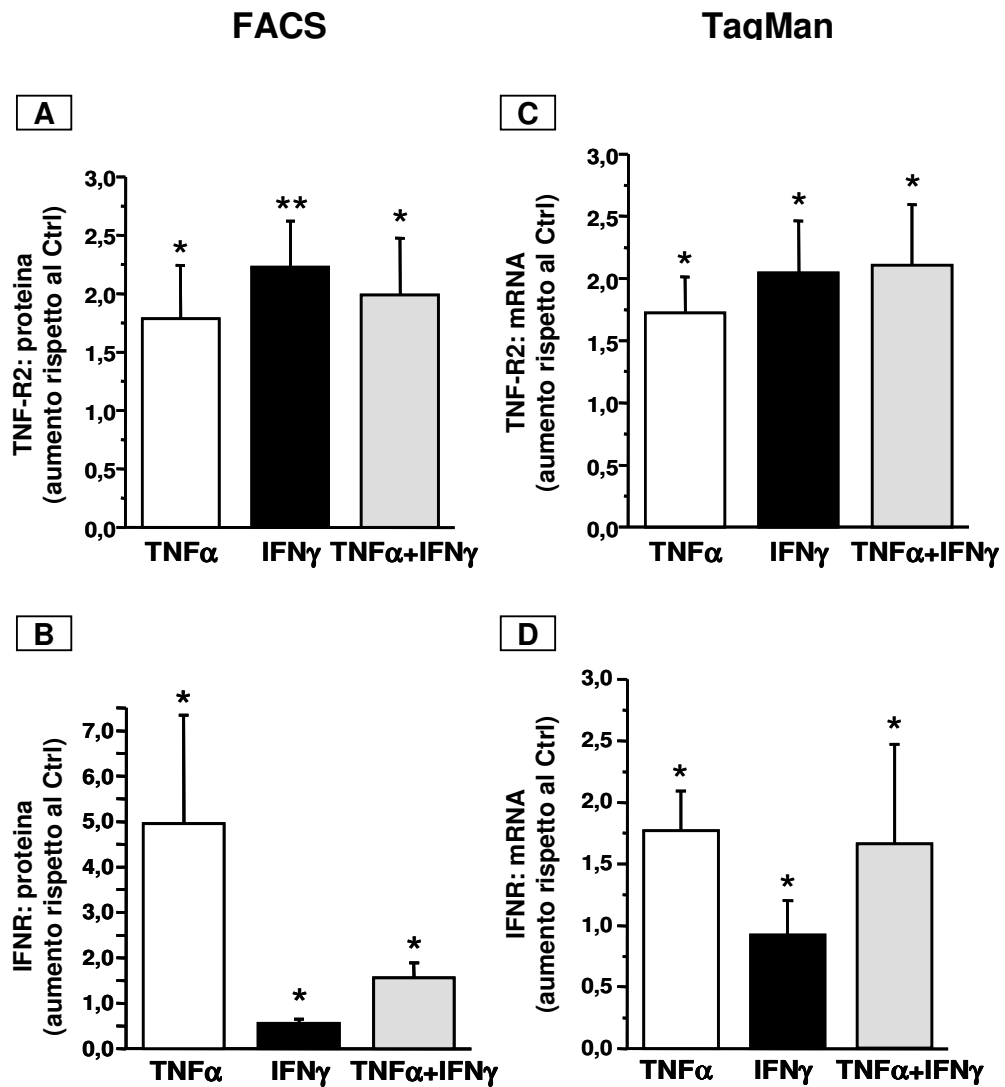
Un altro meccanismo che potrebbe spiegare il sinergismo tra TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  potrebbe essere una reciproca regolazione positiva (*up-regulation*) dell'espressione dei propri recettori. In letteratura è stato infatti già descritto un meccanismo a *loop* positivo in cui il TNF $\alpha$  determina una *up-regulation* dei recettori per l'IFN $\gamma$  (IFNR), e viceversa l'IFN $\gamma$  induce una *up-regulation* dei recettori per il TNF $\alpha$  (TNF-R).

Abbiamo quindi indagato se, anche nel nostro modello cellulare, l'azione sinergica delle due citochine potesse derivare almeno in parte da un meccanismo di questo tipo. Mediante due tecniche diverse, l'analisi citofluorimetrica e la real time quantitative RT-PCR, abbiamo analizzato rispettivamente l'espressione proteica superficiale e l'mRNA del TNF-R2 e del IFNR in seguito a stimoli di 24 h con TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  (Fig. 26). Il trattamento con IFN $\gamma$  induce un leggero aumento, di circa due volte, sia dell'espressione superficiale del TNF-R2 (Fig. 26A) sia dell'mRNA codificante il recettore stesso (Fig. 26C). Il trattamento con il TNF $\alpha$  determina un aumento sia dell'espressione superficiale del IFNR (Fig. 26B) sia dell'mRNA codificante il recettore stesso (Fig. 26D) sebbene l'aumento di espressione della proteina (circa 5 volte) risulti più alto di quello del rispettivo mRNA. Il recettore di tipo 1 per il TNF $\alpha$  (TNF-R1) non sembra essere modulato né dal trattamento con TNF $\alpha$  né da quello con IFN $\gamma$  (dati non mostrati).

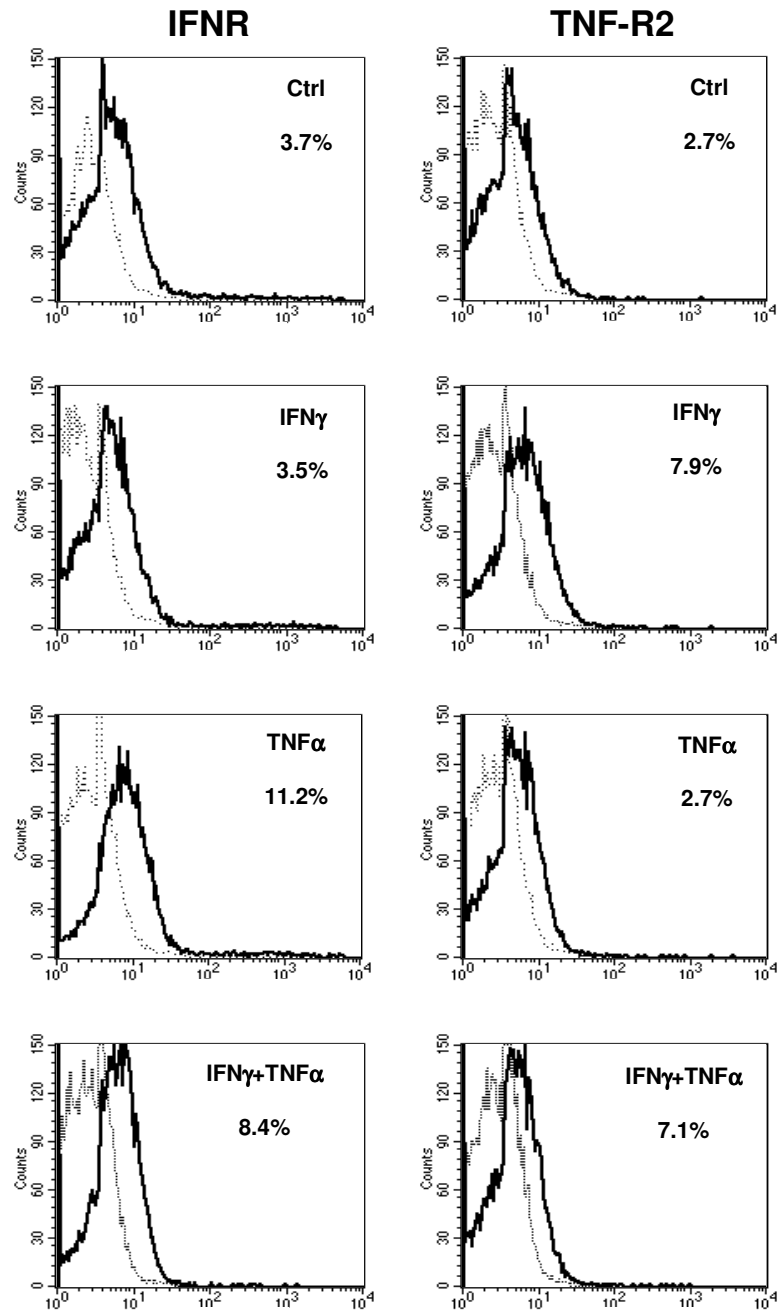
La simultanea aggiunta delle due citochine determina su entrambi i recettori un effetto simile a quello ottenuto con una l'aggiunta di una singola citochina; l'IFN $\gamma$  da solo, induce invece una riduzione dell'espressione del proprio recettore, apprezzabile in modo più evidente a livello proteico (analisi FACS, Fig. 26B) che a livello di mRNA (analisi TaqMan, Fig. 26D).

Abbiamo inoltre indagato se il RGZ o l'U0126 potessero influenzare l'espressione dei recettori del TNF $\alpha$  e dell'IFN $\gamma$ : nessuno dei due composti si è però dimostrato in grado di modularne l'espressione (dato non mostrato).

In Fig. 27 (pannelli A-H) sono rappresentati gli istogrammi citofluorimetrici, relativi ad un singolo esperimento, rappresentanti l'espressione superficiale del TNF-R2 e del IFNR in risposta al TNF $\alpha$  e/o all'IFN $\gamma$ .



**Fig.26:** Valutazione dell'espressione proteica e dell'mRNA dei recettori per il TNF $\alpha$  (TNF-R2) e l'IFN $\gamma$  (IFNR), effettuata rispettivamente in citometria a flusso (A, B, n=6) e in TaqMan (C, D n=4), a 24 h dallo stimolo delle cellule HMEC-1 con 1 ng/ml TNF $\alpha$  e 100 U/ml IFN $\gamma$ , usati singolarmente o in combinazione. I valori sono espressi come "aumento di espressione" rispetto ai controlli non trattati. Media $\pm$ S.E.M. \*P<0.05, \*\*P<0.01 verso i rispettivi controlli assunti come 1.

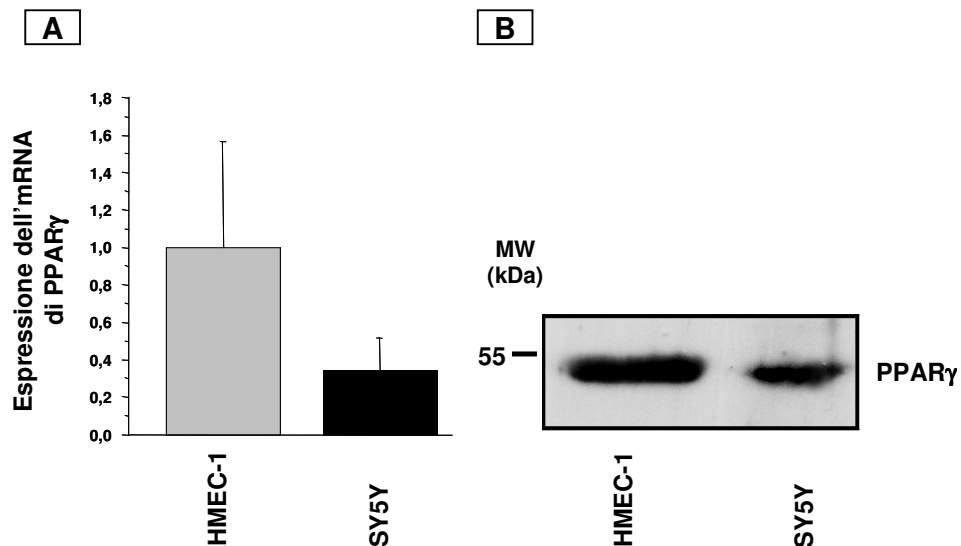


**Fig.27:** Istogrammi citofluorimetrici, relativi ad un singolo esperimento, rappresentanti l'espressione superficiale del TNF-R2 e del IFNR in risposta al trattamento con TNF $\alpha$  e/o IFN $\gamma$ . La linea continua rappresenta la colorazione con anticorpi anti-TNF-R2 (a destra) o anti-IFNR (a sinistra) mentre la linea discontinua rappresenta la colorazione con anticorpi monoclonali di controllo isotipico. In ciascun pannello è indicato il trattamento effettuato e la percentuale di cellule positive rilevate.



### 3.9 Studi sul possibile coinvolgimento di PPAR $\gamma$ nel mediare gli effetti inibitori del RGZ sulla risposta citochinica/chemochinica indotta dal TNF $\alpha$ e dall'IFN $\gamma$

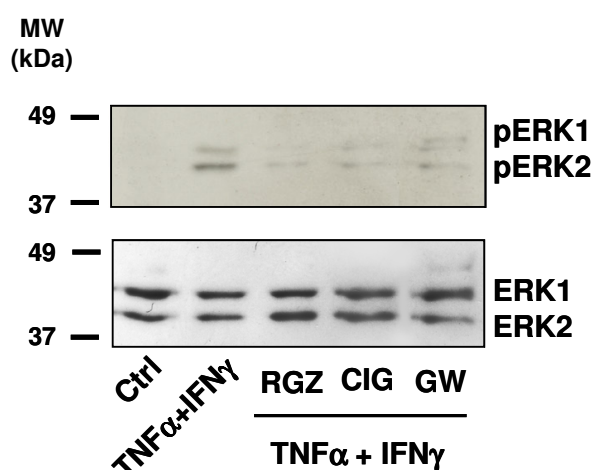
I tiazolidinedioni (TZDs), classe farmaceutica di cui il RGZ fa parte, sono ligandi di PPAR $\gamma$ , e molte delle loro azioni sono in effetti mediate dal legame con questo recettore. Tuttavia, sono numerose le evidenze sperimentali che attribuiscono ai TZDs degli effetti indipendenti dal recettore PPAR $\gamma$ . Quindi, per cercare di chiarire se PPAR $\gamma$  fosse coinvolto o meno nel mediare la rapida inibizione di ERK1/2 indotta dal RGZ abbiamo innanzitutto verificato se nel nostro modello cellulare il recettore fosse espresso. In effetti, al pari della linea cellulare di neuroblastoma SY5Y, usata come controllo positivo, le HMEC-1 esprimono PPAR $\gamma$  sia a livello di mRNA che a livello proteico come evidenziato con le tecniche TaqMan e Western blot (Fig. 28A,B).



**Fig.28:** Valutazione dell'espressione di PPAR $\gamma$  a livello proteico (B) e di mRNA (A) nelle cellule HMEC-1, rispettivamente mediante analisi Western blot (B) e tecnica TaqMan (A).

Uno degli approcci utilizzati per verificare se PPAR $\gamma$  fosse coinvolto nel mediare la rapida inibizione di ERK1/2 da parte del RGZ è stato quello di testare

la capacità di altri agonisti di PPAR $\gamma$  di revertire l'attivazione di ERK1/2 indotta dallo stimolo infiammatorio TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ . In Fig. 29 si può osservare come sia il ciglitazone (CIG), un altro TZD, sia il GW1929, un ligando di PPAR $\gamma$  non appartenente alla famiglia dei TZDs, siano in grado di inibire, similmente al RGZ, la fosforilazione/attivazione di ERK1/2 indotta da uno stimolo rapido (15') con TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ . Questo risultato induce ad ipotizzare che il recettore PPAR $\gamma$  possa essere effettivamente coinvolto nel mediare le azioni inibitorie del RGZ.

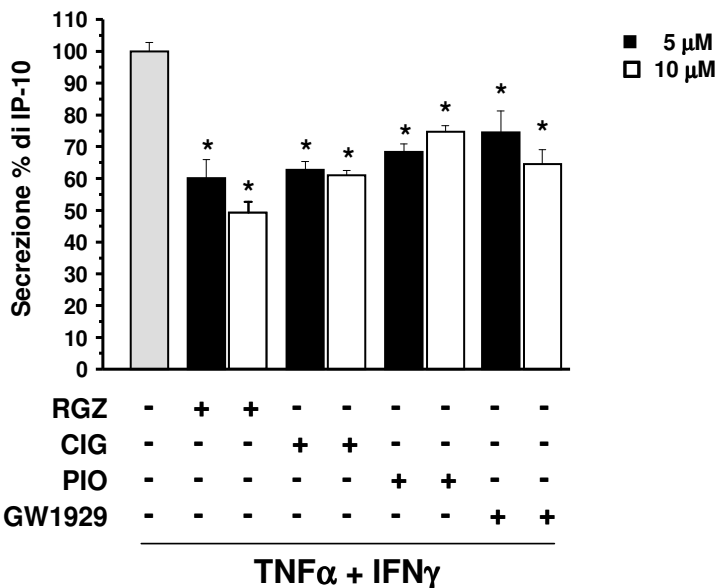


**Fig.29:** Analisi Western blot di cellule HMEC-1 trattate per 15' con 1 ng/ml TNF $\alpha$ +100 U/ml IFN $\gamma$ , in presenza o meno di RGZ (10  $\mu$ M), CIG (10  $\mu$ M) e GW1929 (10  $\mu$ M). Anti-pERK1/2 e dopo stripping normalizzazione per ERK1/2.

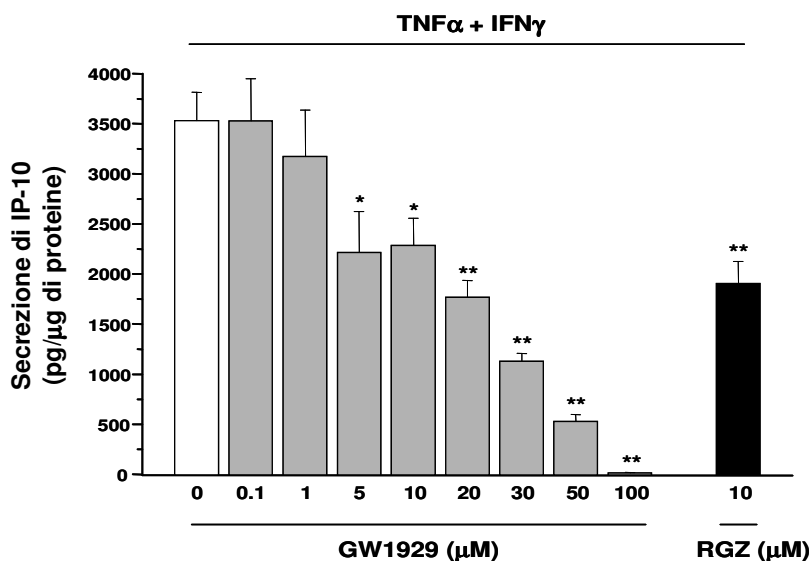
Un altro risultato in linea con questa ipotesi deriva da un esperimento in cui è stata valutata la capacità di diversi ligandi di PPAR $\gamma$  di inibire la secrezione di IP-10. Il ciglitazone, il pioglitazone (PIO) ed il composto non glitazonico GW1929 sono in effetti capaci di inibire la secrezione di IP-10 indotta da un trattamento di 24 h con TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  (Fig. 30). In Fig. 30 è mostrata la percentuale di inibizione della secrezione di IP-10 ottenuta con due diverse dosi (5 e 10  $\mu$ M) di ciascun agonista di PPAR $\gamma$ : tutti i ligandi di PPAR $\gamma$  presentano una capacità inibitoria paragonabile a quella esercitata dal RGZ che comunque è il più efficace di tutti.

Per il GW1929 è stata inoltre effettuata una curva dose risposta che ha evidenziato come anch'esso, al pari del RGZ, determina un'inibizione dose

dipendente della secrezione di IP-10 indotta dal trattamento di 24 h con  $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\gamma$  (Fig. 31).

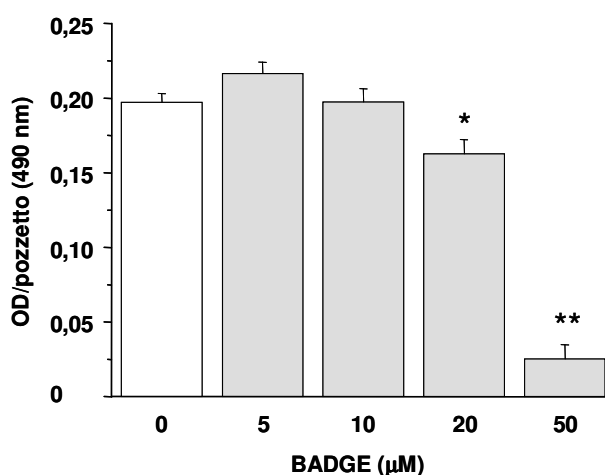


**Fig.30:** Valutazione della secrezione di IP-10 in seguito ad un trattamento di 24 h con 1 ng/ml  $\text{TNF}\alpha + 100$  U/ml  $\text{IFN}\gamma$  in presenza o meno di RGZ (5, 10  $\mu\text{M}$ ), CIG (5, 10  $\mu\text{M}$ ), PIO (5, 10  $\mu\text{M}$ ) e GW1929 (5, 10  $\mu\text{M}$ ). Media percentuale  $\pm$  SE versus  $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\gamma$ ; n=6, \*P<0.001 versus  $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\gamma$ .



**Fig.31:** Valutazione della secrezione di IP-10 a 24 h dal trattamento delle HMEC-1 con 1 ng/ml  $\text{TNF}\alpha + 100$  U/ml  $\text{IFN}\gamma$ , in presenza di dosi scalari crescenti di GW1929 (0-100  $\mu\text{M}$ ) o di RGZ (10  $\mu\text{M}$ ). Media  $\pm$  SE da n=4 esperimenti. \*P<0.05, \*\*P<0.001 versus 0  $\mu\text{M}$  GW1929.

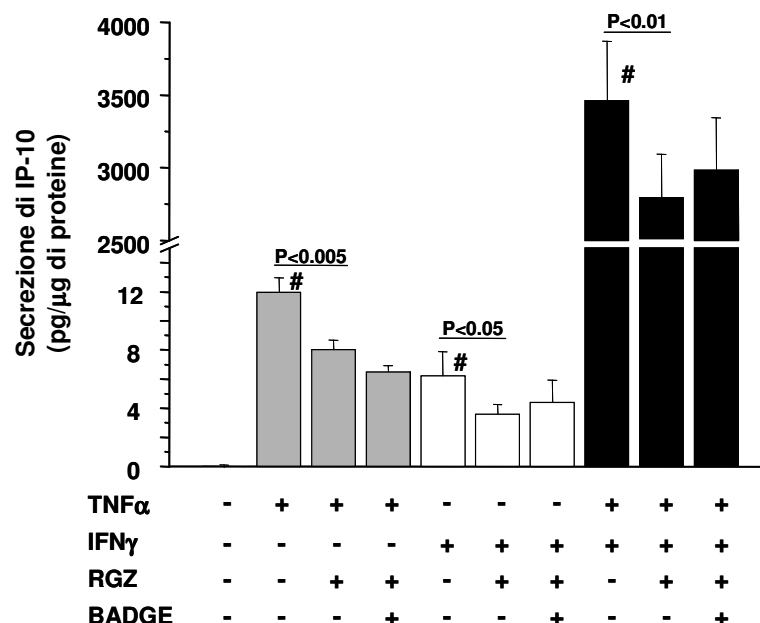
Un altro approccio utilizzato per studiare il ruolo di PPAR $\gamma$  nel mediare le azioni del RGZ è stato quello che si avvale dell'uso di antagonisti del recettore stesso. Un noto antagonista dell'attività trascrizionale, indotta dai TZDs, di PPAR $\gamma$  è il BADGE (bisphenol A diglycidyl ether). Dal momento che a questo composto sono stati ascritti effetti tossici *in vitro*, ne abbiamo innanzitutto valutato la tossicità a 24 h sul nostro modello cellulare. In Fig. 32 è riportata la vitalità cellulare relativa a dosi crescenti di BADGE, stimata mediante dosaggio MTS. La concentrazione di BADGE scelta per i successivi esperimenti è quella 10  $\mu$ M che non si è rivelata tossica sulle HMEC-1 e che è descritta essere efficace come antagonista dell'attività trascrizionale di PPAR $\gamma$  (151).



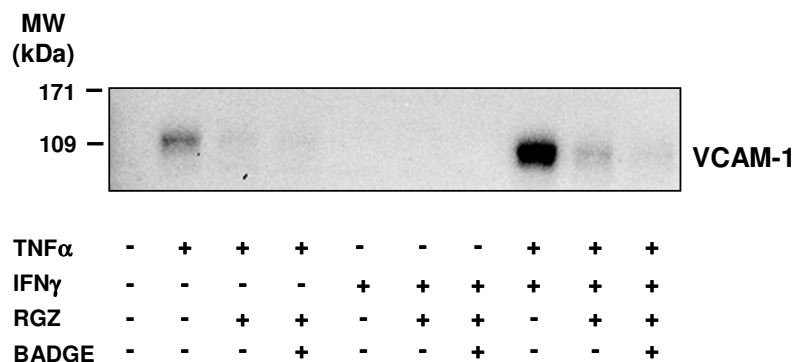
**Fig.32:** Valutazione della vitalità cellulare, mediante tecnica MTS, a 24 h di trattamento con dosi crescenti di BADGE (5-20  $\mu$ M). La vitalità è espressa come assorbimento (OD) a 490 nm; i valori rappresentano la media $\pm$ SE da n=3 esperimenti; \*P<0.01, \*\*P<0.001 versus 0  $\mu$ M BADGE.

Per verificare se gli effetti a lungo termine del RGZ sulla risposta agli stimoli infiammatori con TNF $\alpha$  e/o IFN $\gamma$  (secrezione a 24 h di IP-10 ed espressione delle molecole CAM) fossero mediati, oltre che attraverso la modulazione della fosforilazione di ERK1/2, anche dalla classica via di regolazione dell'attività trascrizionale di PPAR $\gamma$  abbiamo ripetuto gli esperimenti di secrezione di IP-10 in presenza o meno di BADGE. Il BADGE non sembra essere in grado di revertire in

modo significativo gli effetti inibitori del RGZ sulla secrezione di IP-10 indotta da TNF $\alpha$  e/o IFN $\gamma$  (Fig. 33). Inoltre, come è possibile osservare dall'analisi Western blot di Fig. 34, anche l'inibizione da parte del RGZ dell'espressione di VCAM-1, indotta da uno stimolo di 24 h con TNF $\alpha$  o TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ , non è revertita dalla presenza del BADGE.



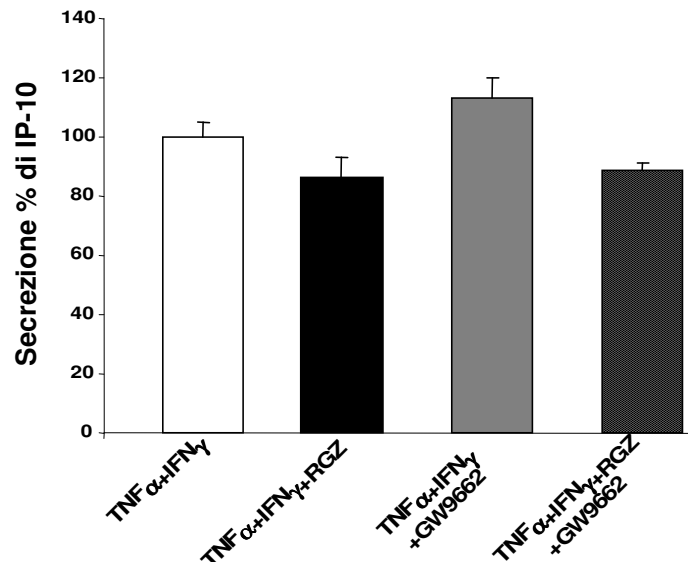
**Fig.33:** Valutazione della secrezione di IP-10 a 24 h dal trattamento delle HMEC-1 con 1 ng/ml TNF $\alpha$  e 100 U/ml IFN $\gamma$ , usati da soli o in combinazione, in presenza o meno di RGZ (10  $\mu$ M) e/o BADGE (10  $\mu$ M). I valori rappresentano la media $\pm$ SE da n=4 esperimenti. #P<0.001 versus Ctrl.



**Fig.34:** Analisi Western blot di cellule HMEC-1 trattate per 24 h con 1 ng/ml TNF $\alpha$  e 100 U/ml IFN $\gamma$ , usati singolarmente o in combinazione, in presenza o meno di RGZ (10  $\mu$ M) e BADGE (10  $\mu$ M).

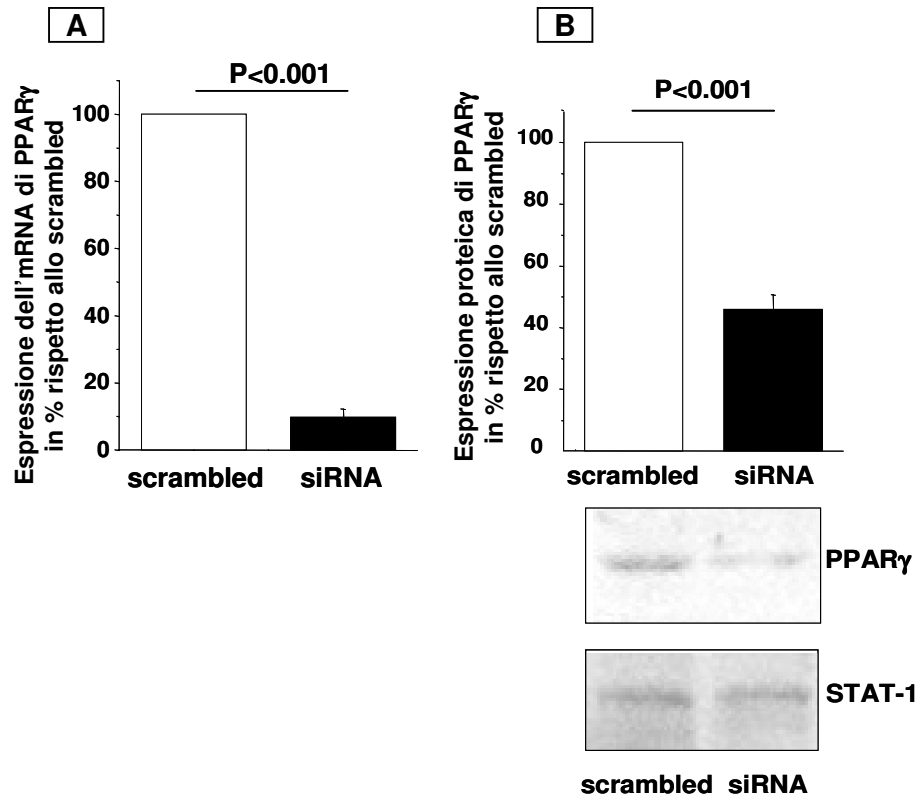
Questi risultati suggeriscono che l'azione inibitoria del RGZ sulla risposta infiammatoria indotta da  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  non sia mediata dall'attività di trans-attivazione/trans-repressione trascrizionale di  $\text{PPAR}\gamma$ . Tuttavia non è possibile escludere la possibilità che il recettore sia diversamente coinvolto, mediante ad esempio meccanismi indipendenti dalla regolazione dell'attività trascrizionale.

Abbiamo inoltre testato l'azione del GW9662 (2-cloro-5-nitrobenzanilide) un altro antagonista di  $\text{PPAR}\gamma$  noto per essere un inibitore potente, selettivo e ad alta affinità (152). Dopo aver valutato, con un saggio MTS di vitalità, la tossicità di diverse dosi del composto (dato non mostrato) abbiamo scelto la concentrazione 10  $\mu\text{M}$  rivelatasi non tossica. Abbiamo quindi saggiato la capacità del GW9662 di revertire l'azione inibitoria del RGZ sulla secrezione di IP-10 indotta da uno stimolo di 24 h con  $\text{TNF}\alpha$ + $\text{IFN}\gamma$ . Anche in questo caso, in accordo con quanto osservato con il BADGE, l'antagonista di  $\text{PPAR}\gamma$  GW9662 non sembra in grado di revertire l'azione inibitoria del RGZ (Fig. 35).



**Fig.35:** Valutazione della secrezione di IP-10 a 24 h dal trattamento delle HMEC-1 con 1 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$ +100 U/ml  $\text{IFN}\gamma$ , in presenza o meno di RGZ (10  $\mu\text{M}$ ) e/o GW9662 (10  $\mu\text{M}$ ). Valori medi in n=2 esperimenti.

Questi risultati sembrano indicare un non-coinvolgimento di PPAR $\gamma$  nel mediare gli effetti inibitori del RGZ ed appaiono quindi in contrasto con quanto osservato invece con diversi tipi di agonisti di PPAR $\gamma$ . In realtà, gli antagonisti di PPAR $\gamma$  potrebbero limitarsi ad inibire la sua attività di regolatore trascrizionale e quindi non è escluso che gli effetti rapidi del RGZ, che non comportano attività trascrizionale, non possano essere mediati da PPAR $\gamma$ . Per dirimere la questione sul coinvolgimento di PPAR $\gamma$  nel mediare gli effetti inibitori del RGZ sulla secrezione di IP-10 abbiamo effettuato il silenziamento del recettore. In Fig. 36 sono mostrati i risultati sull'efficacia della procedura di silenziamento di PPAR $\gamma$  sia a livello di mRNA (A) che di proteina (B).



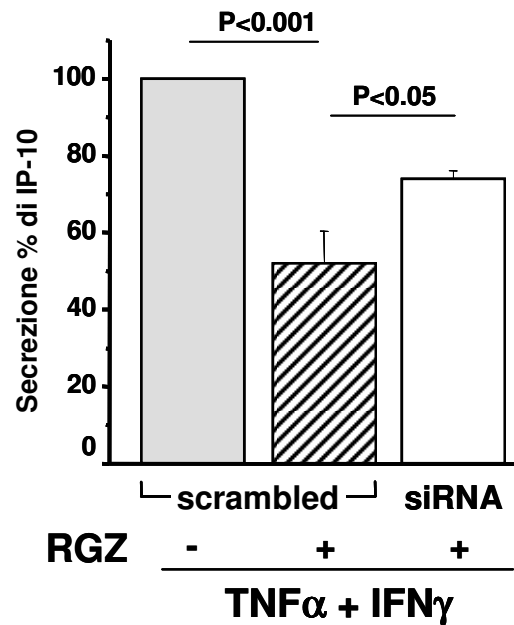
**Fig.36:** Valutazione dell'efficienza del silenziamento di PPAR $\gamma$  in cellule HMEC-1 a 48 h dalla procedura di silenziamento. (A): espressione percentuale dell'mRNA di PPAR $\gamma$  in cellule silenziate (siRNA) versus l'espressione in cellule di controllo (scrambled). (B): analisi densitometrica delle bande proteiche relative a PPAR $\gamma$ , in cellule silenziate (siRNA) e in cellule di controllo (scrambled), ottenute da analisi Western blot come quella in figura (anti-PPAR $\gamma$  e normalizzazione per STAT-1).

Nelle cellule “siRNA” (silenziate per PPAR $\gamma$ ) è stata ottenuta un’inibizione dell’espressione dell’mRNA di PPAR $\gamma$  di circa il 90% valutata rispetto all’espressione dell’mRNA di PPAR $\gamma$  in cellule “scrambled” di controllo, a 48 h dal silenziamento (media della percentuale di inibizione dell’mRNA $\pm$ SE: 90,2 $\pm$ 2,4) (Fig. 36A). Le cellule dette “controllo scrambled” sono cellule che sono state sottoposte a tutte le fasi della procedura di silenziamento ma che, invece di essere transfettate con il siRNA per PPAR $\gamma$ , sono state transfettate con un costruito siRNA “scrambled” che, non riconoscendo alcun mRNA, non induce silenziamento genico. A 48 h dal silenziamento, la procedura ha determinato nelle cellule “siRNA” una riduzione di PPAR $\gamma$  di circa il 50% rispetto ai livelli presenti in cellule “scrambled” di controllo (media della percentuale di inibizione proteica $\pm$ SE: 54,2 $\pm$ 4,8); la valutazione della percentuale di inibizione dell’espressione proteica di PPAR $\gamma$  è stata effettuata tramite analisi densitometrica delle bande proteiche corrispondenti a PPAR $\gamma$ , ottenute mediante tecnica Western blot, in cellule “scrambled” e “siRNA” (Fig. 36B).

Dopo aver messo a punto la tecnica di silenziamento e verificato la sua efficacia, abbiamo allestito un nuovo esperimento per studiare quali conseguenze comporta il silenziamento di PPAR $\gamma$  sull’azione inibitoria del RGZ (Fig. 37).

In cellule “scrambled” di controllo il trattamento di 24 h con lo stimolo infiammatorio TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  induce, come atteso, la secrezione di IP-10 mentre la concomitante presenza di RGZ ne inibisce significativamente la secrezione (Fig. 37). Il silenziamento di PPAR $\gamma$  determina invece una significativa reversione dell’inibizione (operata dal RGZ) della secrezione di IP-10. Questo risultato suggerisce che almeno una parte degli effetti del RGZ siano mediati da PPAR $\gamma$ . Tuttavia, dal momento che la reversione dell’azione inibitoria del RGZ sulla secrezione di IP-10, ottenuta mediante silenziamento di PPAR $\gamma$ , non è completa non si può escludere che una parte degli effetti del RGZ siano indipendenti da PPAR $\gamma$ .





**Fig.37:** Secrezione percentuale di IP-10 in cellule silenziate (siRNA) per PPAR $\gamma$  o in cellule di controllo (scrambled) a seguito di un trattamento di 24 h con 1 ng/ml TNF $\alpha$ +100 U/ml IFN $\gamma$ . Media percentuale+SE versus il controllo (scrambled), da n=4 esperimenti.

Abbiamo invece solo risultati preliminari e contrastanti sulle conseguenze che il silenziamento di PPAR $\gamma$  determina sull'azione a breve termine del RGZ, cioè sull'inibizione a 15' di ERK1/2. Si rendono quindi necessari nuovi esperimenti per chiarire se a seguito del silenziamento di PPAR $\gamma$  il RGZ sia ancora in grado di inibire ERK1/2; se così fosse si avrebbe a che fare con azioni PPAR $\gamma$ -indipendenti, mentre se si verificasse una reversione dell'effetto inibitorio del RGZ ci troveremmo di fronte ad un meccanismo di azione direttamente mediato dal recettore PPAR $\gamma$  come d'altra parte sembra indicare anche l'esperimento di Fig. 29.

## Discussione

Le cause ma anche le sedi di innesco di un processo infiammatorio possono essere di natura estremamente diversa, come d'altra parte sono molteplici e varie le patologie che vedono proprio nel processo infiammatorio una comune origine. Basti pensare infatti alla sindrome metabolica, al diabete di tipo 2 con le associate microangiopatie, retinopatia e nefropatia diabetiche, al rigetto da trapianto e alle connesse vasculopatie, o ad esempio al danno da ri-perfusione che mina il microcircolo cardiaco compromettendo la funzionalità del muscolo cardiaco. In ciascuno di questi casi, l'endotelio si trova ad avere il duplice ruolo di "vittima", cioè *target* del danno, e di "protagonista attivo" nell'amplificazione del processo infiammatorio stesso, attraverso l'espressione di molecole di adesione e la secrezione di citochine e chemochine che modulano la funzione del sistema immunitario. La risposta endoteliale all'infiammazione gioca quindi un ruolo chiave nelle fasi precoci dello sviluppo di numerose patologie croniche quali il T2DM, l'insulino-resistenza, la sindrome metabolica, l'aterosclerosi e le vasculopatie e il rigetto da trapianto. È evidente come diventi di primaria importanza nell'approccio terapeutico, riuscire a controllare e a risolvere il processo infiammatorio indipendentemente dalla causa scatenante. Inoltre, dal momento che la disfunzione endoteliale costituisce spesso una fase precoce di molte di queste patologie su base multifattoriale, non solo risulta essere uno degli stadi più importanti da affrontare ma potenzialmente anche il più facilmente trattabile.

In quest'ottica capire come il processo infiammatorio si sviluppa e come è regolato risulta essere di primaria importanza.

L'IFN $\gamma$ , secreto principalmente dai linfociti T attivati, rappresenta la più importante citochina di tipo Th1, mentre il TNF $\alpha$  secreto da monociti, macrofagi e cellule residenti è considerata una citochina pleiotropica coinvolta in una

risposta infiammatoria di tipo generico. In sede infiammatoria, entrambe le citochine sono prodotte ad alti livelli ed agiscono sulle cellule endoteliali modulandone la risposta, guidando in questo modo l'evoluzione del processo infiammatorio e determinando l'entità del danno endoteliale.

Partendo dal presupposto che sono i vasi del microcircolo sanguigno ad essere più comunemente affetti da disordini vascolari (2), nel nostro studio abbiamo scelto come modello cellulare le HMEC-1, cellule endoteliali umane da microcircolo; mediante l'uso di TNF $\alpha$  e/o IFN $\gamma$  abbiamo quindi riprodotto *in vitro* un contesto infiammatorio per andare a studiare i meccanismi intracellulari coinvolti nel mediare la risposta endoteliale allo stimolo infiammatorio.

Una delle prime osservazioni effettuate è che, nelle ECs, non è solo l'IFN $\gamma$  ad indurre, in modo dose dipendente, la secrezione di IP-10 ma è anche il TNF $\alpha$ . Da notare è inoltre il fatto che dosi crescenti di TNF $\alpha$  inducono, rispetto alla corrispondente dose equimolare di IFN $\gamma$ , una secrezione di IP-10 più alta. In letteratura è ad esempio riportato che nelle ECs da microcircolo il TNF $\alpha$  induce la secrezione di diverse citochine ma tra queste non l'IP-10 (153) e che in cellule residenti il TNF $\alpha$ , diversamente dall'IFN $\gamma$ , non induce produzione di IP-10 (154): questo sembra quindi essere la prima osservazione sul ruolo del TNF $\alpha$  nell'induzione della secrezione di IP-10.

La secrezione di IP-10 è caratteristica di una risposta infiammatoria di tipo Th1 in cui i linfociti T CD4<sup>+</sup>, reclutati al sito infiammatorio dall'IP-10 stesso, producono IFN $\gamma$ . Si instaura in questo modo un *loop* positivo "autoalimentante" tra linfociti Th1, produttori IFN $\gamma$ , e ECs stimulate dall'IFN $\gamma$  a secernere IP-10. L'IP-10 non solo media il reclutamento linfocitario ma ne stimola la proliferazione e induce la produzione di IFN $\gamma$  (78, 87).

In questo scenario è ipotizzabile che il TNF $\alpha$ , dimostratosi in grado di indurre nelle HMEC-1 la secrezione di IP-10, possa contribuire, anche a basse dosi, ad avviare il reclutamento dei linfociti Th1 al sito infiammatorio. La risposta endoteliale, una volta avviata, viene poi amplificata grazie alla specifica

secrezione citochinica dei linfociti Th1 reclutati. In effetti la curva dose-risposta dell'IP-10, ottenuta in risposta allo stimolo con l'IFN $\gamma$ , non raggiunge il plateau a nessuna delle dosi utilizzate, diversamente da quanto accade per il TNF $\alpha$ . Questo suggerisce che il sistema recettoriale dell'IFN $\gamma$  non sia saturabile e che il *loop* positivo instaurato dai linfociti Th1 possa essere il principale responsabile del mantenimento della secrezione di IP-10 da parte dell'endotelio.

L'IFN $\gamma$  e il TNF $\alpha$ , quando usati in combinazione, manifestano un marcato effetto sinergico sulla secrezione di IP-10. L'effetto cooperativo delle due citochine è maggiore quando il TNF $\alpha$  è aggiunto all'IFN $\gamma$ : rispetto all'IFN $\gamma$  usato singolarmente, l'aggiunta di TNF $\alpha$  determina infatti un aumento di secrezione di circa 700 volte mentre, rispetto al TNF $\alpha$  usato singolarmente, l'aggiunta di IFN $\gamma$  determina un aumento di secrezione di sole 60 volte.

I nostri risultati dimostrano che il TNF $\alpha$  e l'IFN $\gamma$ , oltre ad attivare rispettivamente le vie di segnalazione classiche di NF- $\kappa$ B e STAT-1, inducono una rapida attivazione per fosforilazione di ERK1/2. Abbiamo inoltre dimostrato che questa attivazione di ERK1/2 è profondamente coinvolta nel mediare la secrezione di IP-10 indotta da TNF $\alpha$  e/o IFN $\gamma$ : il fenomeno infatti viene significativamente revertito, anche se parzialmente, dall'inibizione dell'attività di MEK1 ad opera dell'U0126.

Nonostante la via di *signaling* delle MAPK sia stata già descritta mediare alcuni degli effetti di TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  sulla secrezione citochinica (155), questa è la prima volta che viene dimostrato che l'attivazione di ERK1/2 media la secrezione di IP-10 indotta da TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Certamente i meccanismi di segnalazione intracellulare alla base di questo fenomeno sono poco noti: nei mastociti è stato ad esempio osservato che il TNF $\alpha$  induce la secrezione di IP-10 attraverso NF- $\kappa$ B e p38-MAPK ma non mediante ERK (156), in cellule di melanoma è stato invece rilevato che la sintesi di IP-10 indotta da IFN $\gamma$  può essere soppressa dall'inibizione del fattore trascrizionale STAT-1 (157).

Gli effetti anti-infiammatori dei ligandi di PPAR $\gamma$  sono ampiamente sotto studio e numerosi sono i lavori che hanno evidenziato effetti benefici dei TZDs sui marker infiammatori; nelle vasculopatie, ad esempio, i TZDs sono in grado di inibire gli effetti proinfiammatori indotti dall'azione dell'IFN $\gamma$  (114).

I nostri dati dimostrano che il RGZ inibisce la secrezione di IP-10 indotta da TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  in modo dose dipendente e con un IC50 di circa 8,85  $\mu$ M: l'effetto inibitorio del RGZ è sostanzialmente indipendente dalla dose di citochine utilizzata e questo suggerisce che le proprietà anti-infiammatorie di questa molecola possano essere sfruttate qualsiasi siano i livelli raggiunti, al sito infiammatorio, dalle due citochine. Il RGZ inibisce anche l'espressione proteica delle proteine di adesione cellulare ICAM-1 e VCAM-1, indotte a seguito dello stimolo infiammatorio, come d'altra parte è già stato descritto anche per il troglitazone (158, 159).

Molti dei lavori presenti in letteratura sostengono che le proprietà anti-infiammatorie dei TZDs siano sostanzialmente attribuibili alla loro capacità di interferire, sia *in vivo* (143, 160, 161) che *in vitro* (140), con l'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B. Tuttavia, i meccanismi molecolari alla base dei molteplici effetti dei TZDs non sono del tutto chiariti.

I nostri risultati permettono di escludere che il RGZ agisca influenzando la fosforilazione (e la conseguente degradazione) di I $\kappa$ B o inibendo la rapida attivazione per fosforilazione di STAT-1, indotte rispettivamente da TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , ma ovviamente non escludono che il RGZ possa agire subito a valle dell'evento di fosforilazione, andando ad interferire con l'attività trascrizionale di questi due fattori, con un meccanismo noto come "trans-repressione trascrizionale". Tuttavia, i nostri esperimenti evidenziano come il RGZ possa agire attraverso un meccanismo del tutto nuovo che prevede la rapida inibizione della fosforilazione/attivazione di ERK1/2, indotta da TNF $\alpha$  e/o IFN $\gamma$ . Il fatto che l'inibizione di ERK1/2 sia profondamente coinvolta nel mediare gli effetti anti-infiammatori del RGZ sulla secrezione di IP-10 indotta da TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ , è fortemente supportato dalla capacità degli inibitori della via di *signaling* di ERK

(U0126, inibitore di MEK1) di inibire tale secrezione. Inoltre, l'incapacità del RGZ di inibire la produzione costitutiva di IP-10 in cellule HMEC-1 trasdotte con il dominante positivo di MEK1, sottolinea ulteriormente l'importanza di ERK1/2 nel mediare la secrezione di IP-10. Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono che gli effetti anti-infiammatori dei TZDs sull'endotelio di microcircolo, non siano mediati solo dalla classica interferenza con l'attività trascrizionale di NF- $\kappa$ B, ma che siano dovuti anche all'inibizione di ERK1/2. Effetti di tipo non-genomico sono già stati descritti per i TZDs, ma questa è la prima volta in cui si dimostra che i ligandi di PPAR $\gamma$  possono inibire la rapida attivazione di ERK1/2. Questi risultati sono in linea con le sempre più numerose evidenze sperimentali che attribuiscono ai TZDs effetti rapidi di tipo non-genomico, che non comportano cioè la modulazione della trascrizione genica ma prevedono modificazioni post-traduzionali di proteine appartenenti a specifiche vie di segnalazione cellulare (162-164). Il lavoro di LeBrasseur *et al.* ha ad esempio dimostrato che i TZDs possono indurre la rapida attivazione della AMPK (AMP-activated protein Kinase) (109), mentre il lavoro di von Knethen *et al.* (165) ha evidenziato come, nei monociti, PPAR $\gamma$ , attivato dal ligando, interagisce direttamente con la PKC $\alpha$  attenuandone la traslocazione dal citosol alla membrana. Inoltre, similmente a quanto da noi osservato, Bai *et al.* hanno riportato che il RGZ inibisce rapidamente la fosforilazione di ERK1/2 e p38-MAPK indotta dal trattamento con omocisteina (166); il gruppo di Appel *et al.* ha dimostrato che gli agonisti di PPAR $\gamma$  inibiscono l'attivazione delle cellule dendritiche (indotta dai TLR) mediante una rapida inibizione della fosforilazione di ERK (167).

Abbiamo inoltre evidenziato come il RGZ, sempre mediante l'inibizione di ERK1/2, possa esercitare la propria azione anti-infiammatoria andando a contrastare l'aumento, indotto dallo stimolo con IFN $\gamma$ , del fattore trascrizionale STAT-1.

Nelle HMEC-1, il meccanismo con cui il RGZ inibisce l'attivazione di ERK1/2 deve ancora essere chiarito; tuttavia, è possibile ipotizzare che questo

meccanismo possa coinvolgere un'interazione diretta, di tipo inibitorio, tra il recettore PPAR $\gamma$  (attivato dal ligando) e le chinasi (attivanti) a monte di ERK o, viceversa, un'attivazione delle fosfatasi di ERK. È stato ad esempio dimostrato che MEK ed ERK possono direttamente interagire con il recettore PPAR $\gamma$ , in questo caso però regolandone negativamente l'attività trascrizionale (118,168). Per quanto riguarda il coinvolgimento di PPAR $\gamma$  nel mediare gli effetti del RGZ i nostri dati, pur non potendo del tutto escludere effetti PPAR $\gamma$  indipendenti, evidenziano l'importanza del diretto coinvolgimento del recettore: la capacità di diversi agonisti di PPAR $\gamma$ , sia appartenenti che non appartenenti alla famiglia dei glitazonici, di inibire la fosforilazione di ERK1/2 ed anche la secrezione di IP-10, indotte dalle citochine infiammatorie TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , suggerisce il coinvolgimento del recettore PPAR $\gamma$ .

Sebbene due antagonisti di PPAR $\gamma$ , il BADGE e il GW9662, non siano stati in grado di revertire significativamente l'azione del RGZ, suggerendo quindi un meccanismo di azione del RGZ indipendente dal recettore, occorre considerare che questi risultati potrebbero essere fuorvianti: infatti, è stato ad esempio riportato che nella linea cellulare ECV304 il BADGE si comporta come agonista di PPAR $\gamma$  (169). D'altra parte, gli antagonisti di PPAR $\gamma$  sono così definiti per la loro capacità di inibire l'attività trascrizionale di PPAR $\gamma$  (170) e quindi il fatto di non avere revertito l'azione del RGZ potrebbe semplicemente indicare che l'azione inibitoria del RGZ sulla risposta infiammatoria non è mediata dall'attività trascrizionale di PPAR $\gamma$ : questo non esclude la possibilità che il recettore sia comunque coinvolto, ma in modo diverso, mediante ad esempio meccanismi indipendenti dalla regolazione dell'attività trascrizionale.

Un quadro più chiaro è stato ottenuto mediante silenziamento genico del recettore PPAR $\gamma$ . I risultati sul silenziamento di PPAR $\gamma$  supportano fortemente un meccanismo PPAR $\gamma$  dipendente: comunque, dal momento che il silenziamento di PPAR $\gamma$  non determina una reversione completa dell'azione inibitoria del RGZ non è possibile discriminare se l'azione inibitoria residua del RGZ sia dovuta ad un

meccanismo PPAR $\gamma$  indipendente o se piuttosto sia imputabile al fatto che, non essendo il silenziamento genico completo, permanga a livello cellulare una piccola quota di recettore attivabile dal RGZ. In altre parole non è possibile escludere che una piccola quota dell'azione del RGZ sia indipendente da PPAR $\gamma$ , tanto più che sono numerose le evidenze sperimentali indicanti che molti degli effetti pleiotropici dei TZDs non richiedono la presenza del recettore PPAR $\gamma$  (135).

Similarmente a quanto osservato per l'IP-10, abbiamo rilevato che il sinergismo tra TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  si verifica anche su altre citochine/chemochine caratterizzanti la risposta infiammatoria, in particolare sull'IL-6 e sulle chemochine Th1 Mig e fractalkina. L'azione sinergica di TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  sembra essere specifica come dimostrato dall'andamento crescente della secrezione/espressione citochinica in risposta a combinazioni scalari crescenti di TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ . La specificità dell'effetto cooperativo tra TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  è ulteriormente supportato dalla diversa azione esercitata dalle due citochine sulla secrezione di IL-8. L'IL-8 infatti non è solo coinvolta nel processo infiammatorio ma esercita anche altre funzioni, essendo ad esempio coinvolta nell'angiogenesi e nel cancro (171). Sull'IL-8, TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  esercitano un effetto cooperativo negativo, infatti mentre il TNF $\alpha$  ne stimola la produzione, l'IFN $\gamma$  la riduce. Per quanto riguarda invece l'effetto sinergico sulla secrezione di Mig, questo assomiglia molto per entità, a quello osservato sull'IP-10 (aumento di secrezione di circa 300 volte rispetto a quella ottenuta con le citochine TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  usate singolarmente): questo può dipendere dal fatto che IP-10 e Mig hanno un'azione molto simile essendo entrambe i ligandi di CXCR3 e contribuendo entrambe a guidare il processo infiammatorio verso una risposta di tipo Th1 (78).

Un discorso a parte merita l'effetto sinergico che si attua sulla fractalkina. La fractalkina è infatti una chemochina unica nel suo genere, in quanto può funzionare sia come molecola chemiotattica sia come molecola di adesione per i linfociti Th1, ma non per i Th2 (106). È stato inoltre dimostrato che la fractalkina, stimolando l'angiogenesi e l'infiammazione vascolare mediante la diretta



attivazione delle vie di segnalazione di ERK/PI3K (172), amplifica e polarizza la risposta infiammatoria verso una risposta di tipo Th1.

Come osservato per l'IP-10, la secrezione di IL-6, Mig e fractalkina, indotta da TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , è mediata dalla rapida attivazione/fosforilazione di ERK1/2 ed è inibita dal RGZ. Anche in questo caso il RGZ diminuisce la secrezione /espressione di queste citochine/chemochine attraverso l'inibizione di ERK1/2.

Sia l'IP-10 che la fractalkina sembrano avere un ruolo chiave nella risposta immunitaria che regola il rigetto da trapianto acuto e cronico: la loro espressione è infatti marcatamente aumentata in organi trapiantati in corso di rigetto (173, 174) e in modelli murini *knockout* per IP-10 o per il suo recettore CXCR3, il trapianto di cuore non subisce un rigetto acuto ed è permanentemente tollerato (94, 175). In modo analogo, in modelli murini CX3CR1(-/-), la delezione del recettore per la fractalkina ha permesso di evidenziare l'importante ruolo di questa chemochina nel rigetto cardiaco (176). Inoltre, il coinvolgimento delle chemochine di tipo Th1, quali Mig, IP-10, nella vasculopatia cronica da trapianto o “*graft arteriosclerosis*” è ben documentato (78, 81, 96-97). Da queste considerazioni appare chiaro come la possibilità di contrastare farmacologicamente la risposta infiammatoria di tipo Th1 possa avere un grande rilievo terapeutico. Numerose e varie sono infatti le patologie accomunate da un processo infiammatorio di tipo Th1, i già citati rigetto da trapianto e vasculopatia cronica da trapianto ma anche diverse malattie endocrine autoimmuni (79, 101-103) e l'aterosclerosi (177,178). È stato dimostrato che a livello delle lesioni aterosclerotiche vi è un accumulo di linfociti Th1 esprimenti il recettore CXCR3 e che le cellule endoteliali (ECs), le cellule muscolari lisce e i macrofagi associati all'ateroma esprimono tutti l'IP-10; Mig e I-TAC sarebbero invece espresse prevalentemente a livello delle ECs e dei macrofagi (177).

I nostri risultati dimostrano che il RGZ agisce sulle ECs attenuando la risposta infiammatoria di tipo Th1 interferendo specificatamente con la secrezione di IP-10 fractalkina e Mig e con l'espressione di molecole di superficie come VCAM-1 e ICAM-1; alla luce quindi del vasto e complesso scenario descritto, il

RGZ potrebbe trovare un utilizzo in tutte quelle condizioni che necessitano di un recupero dell'omeostasi immunitaria, in particolare nell'infiammazione cronica. Il RGZ potrebbe ad esempio coadiuvare la terapia immunosoppressiva e migliorare la sopravvivenza del trapianto: in un modello animale, è stato recentemente osservato che il trattamento con pioglitazone, grazie all'inibizione della secrezione di citochine infiammatorie e all'inibizione della proliferazione delle cellule muscolari lisce, previene il rigetto acuto e cronico nel trapianto di cuore (179).

Nonostante il RGZ sia correntemente utilizzato nel trattamento del diabete le recenti osservazioni derivanti dalla meta-analisi di Nissen e Wolski (145) e dall'analisi ad interim del trial RECORD (180) hanno messo in dubbio la sicurezza di questo farmaco ed hanno evidenziato l'urgenza di studi atti a valutarne il rischio cardiovascolare. Occorre comunque sottolineare che diversi autori hanno criticato lo studio di Nissen sia per la qualità e per la quantità dei dati disponibili utilizzati, che per il tipo di indagine statistica utilizzata (181, 182).

Dopo aver messo in luce l'azione sinergica di  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  sulla secrezione citochinica/chemochinica ci siamo interessati ai meccanismi molecolari che ne sono alla base. Il sinergismo tra  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  è stato descritto in molti sistemi biologici e la concomitante presenza delle due citochine è essenziale per avviare un'adequata risposta infiammatoria e per dirigere la risposta cellulare in corso di infiammazione. L'effetto cooperativo delle due citochine può attuarsi a diversi livelli di "signaling". I nostri risultati confermano che  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IFN}\gamma$  attivano ciascuna specifiche vie segnalatorie, rispettivamente la via di  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  e di  $\text{STAT-1}$ . L'attivazione di queste diverse vie segnalatorie esita nella regolazione trascrizionale di quei clusters di geni, per citochine e molecole di adesione, che possiedono elementi di risposta per  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  e  $\text{STAT-1}$  (153). Comunque, queste vie, pur distinte, non sembrano essere così indipendenti: è stata infatti descritta un'interazione diretta di tipo cooperativo tra  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  e  $\text{STAT-1}$ , sui promotori di geni con gli specifici elementi di risposta per i due fattori di trascrizione (140, 183, 184). Alcuni di questi geni sono anch'essi fattori di trascrizione:  $\text{IRF-1}$  è ad

esempio regolato trascrizionalmente da elementi di risposta GAS e  $\kappa B$  (185, 186) e a sua volta responsabile per l'attivazione di numerosi geni responsivi al  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$  (184). Tra i diversi geni responsivi quelli per Mig per l'IP-10 e per l'IL-8 hanno una organizzazione del promotore simile, contenente sequenze  $\kappa B$ , GAS e ISRE (140, 183).

Accanto all'attivazione delle vie di *signaling* di NF- $\kappa B$  e STAT-1, abbiamo dimostrato che  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$  convergono sulla rapida attivazione di ERK1/2. Dal momento che  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$  agiscono entrambe sulla stessa ERK1/2 non ci si può aspettare alcun effetto sinergico su di essa. Tuttavia, abbiamo evidenziato che l'attivazione di ERK1/2 può esitare in una sua diversa localizzazione intracellulare a seconda che venga attivata dal  $TNF\alpha$  o dall' $IFN\gamma$ . In particolare, a seguito dello stimolo con l' $IFN\gamma$  si verifica una marcata traslocazione nucleare di ERK1/2; il  $TNF\alpha$  determina invece una distribuzione di ERK1/2 più diffusa. In genere, dopo essere stata attivata, ERK1/2 migra nel nucleo per fosforilare specifici fattori trascrizionali e regolare così la proliferazione e il differenziamento. Talvolta, comunque, ERK1/2 attivata può permanere nel citosol dove può fosforilare chinasi, fosfatasi e proteine del citoscheletro o può essere reclutata alla membrana in complessi multimerici associati a recettori di membrana attivati (187-189). Le differenze nella localizzazione intracellulare di ERK1/2, in risposta al  $TNF\alpha$  o all' $IFN\gamma$ , potrebbero determinare l'avvio di vie di *signaling* diverse che a loro volta potrebbero sinergizzare sulla secrezione di IP-10 e di altre citochine /chemochine infiammatorie (Mig, fractalkina, IL-6 etc) o comunque determinare risultati cellulari diversi (187).

Un altro tipo di meccanismo che può spiegare il sinergismo tra  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$ , è la reciproca *up-regulation* dei rispettivi recettori. Questo meccanismo è stato descritto in diversi tipi cellulari; è stato ad esempio riportato che in cellule normali e leucemiche (190) l' $IFN\gamma$  stimola l'espressione superficiale del recettore per il  $TNF\alpha$  mentre nei tireociti (191) e in linee cellulari monocitarie (192, 193) il  $TNF\alpha$  induce un aumento dell' $IFNR$ . I nostri dati evidenziano che l' $IFN\gamma$  stimola

un leggero aumento del TNF-R2, e che il TNF $\alpha$  induce un aumento dell'IFNR di ben 5 volte, sia a livello di mRNA che di proteina. Il fatto che il TNF $\alpha$  abbia sul recettore dell'IFN $\gamma$  un effetto più marcato rispetto a quello esercitato dall'IFN $\gamma$  sul recettore del TNF $\alpha$ , potrebbe suggerire che il TNF $\alpha$  renda le cellule più responsive alla stimolazione con l'IFN $\gamma$ , soprattutto quando questo è presente a livelli molto bassi. Questo sinergismo potrebbe essere di estrema importanza nelle fasi iniziali del processo infiammatorio quando è il TNF $\alpha$  prodotto localmente che guida l'infiammazione: in queste circostanze il TNF $\alpha$  potrebbe sensibilizzare l'endotelio ai livelli molto bassi di IFN $\gamma$  prodotto dagli inizialmente pochi linfociti infiltranti presenti. Dal momento che il recettore per l'IFN $\gamma$  non sembra essere saturabile, l'aumento della sua espressione, operata dal TNF $\alpha$ , può essere fondamentale nel mediare il sinergismo osservato tra le due citochine. Per quanto riguarda il piccolo aumento del TNFR-2 in risposta all'IFN $\gamma$  non è chiaro se sia rilevante ad amplificare la risposta cellulare alle due citochine anche se il TNFR-1 ed il TNFR-2 sembrano entrambi concorrere all'attivazione endoteliale in risposta al TNF $\alpha$  (64). In ogni caso questa è la prima volta che viene dimostrata una contemporanea *up-regulation* crociata dei recettori per le due citochine.

Per riassumere, abbiamo dimostrato che la rapida attivazione di ERK è una importante via segnalatoria che media, a livello endoteliale, la risposta infiammatoria indotta da TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  ed inoltre che il RGZ è in grado di interferire negativamente su questa via segnalatoria.

## Bibliografia

1. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays*. 1994; **16**(12): 901-6.
2. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998; **91**(10): 3527-61.
3. Nicosia S, Oliva D, Bernini F, Fumagalli R. Prostacyclin-sensitive adenylate cyclase and prostacyclin binding sites in platelets and smooth muscle cells. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res*. 1984; **17**: 593-9.
4. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med*. 1996; **47**: 315-31.
5. van 't Veer C, Golden NJ, Kalafatis M, Mann KG. Inhibitory mechanism of the protein C pathway on tissue factor-induced thrombin generation. Synergistic effect in combination with tissue factor pathway inhibitor. *J Biol Chem*. 1997; **272**(12): 7983-94.
6. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Mohanty P. Endothelial dysfunction, inflammation and diabetes. *Rev Endocr Metab Disord*. 2004; **5**(3): 189-97.
7. Rizzoni D, Porteri E, Guelfi D, Muiesan M, Valentini U, Cimino A, Girelli A, Rodella L, Bianchi R, Sleiman I, Rosei EA. Structural alterations in subcutaneous small arteries of normotensive and hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 2002; **103**: 1238-1244.
8. Endermann D, Pu Q, De Ciucesi C, Savoia C, Virdis A, Neves MF, Touyz RM, Schiffrin EL. Persistent remodelling of resistance arteries in type 2 diabetic patients on anti-hypertensive treatment. *Hypertension*. 2004; **43**: 399-404.
9. Monnick SH, van Haelst PL, van Boven AJ, Stroes ES, Tio RA, Plokker TW, Smit AJ, Veeger NJ, Crijns HJ, van Gilst WH. Endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: a comparison of three frequently reported tests. *J Investig Med* 2002; **50**: 19-24.
10. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1986; **315**: 1046-1051.
11. Ruoslahti E, Rajotte D. An address system in the vasculature of normal tissues and tumors. *Annu Rev Immunol*. 2000; **18**: 813-27.
12. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol*. 2007; **178**(10): 6017-22.
13. Bouïs D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*. 2001; **4**(2): 91-102.

14. Schütz M, Friedl P. Isolation and cultivation of endothelial cells derived from human placenta. *Eur J Cell Biol.* 1996; **71**(4): 395-401.
15. Karasek MA. Microvascular endothelial cell culture. *J Invest Dermatol.* 1989; **93**(2 Suppl): 33S-38S.
16. Binion DG, West GA, Ina K, Ziats NP, Emancipator SN, Fiocchi C. Enhanced leukocyte binding by intestinal microvascular endothelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 1997; **112**(6): 1895-907.
17. Kern PA, Knedler A, Eckel RH. Isolation and culture of microvascular endothelium from human adipose tissue. *J Clin Invest.* 1983; **71**(6): 1822-9.
18. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol.* 1992; **99**: 683-90.
19. Swerlick RA, Lee KH, Li LJ, Sepp NT, Caughman SW, Lawley TJ. Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J Immunol.* 1992; **149**(2): 698-705.
20. Petzelbauer P, Bender JR, Wilson J, Pober JS. Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture. *J Immunol.* 1993; **151**(9): 5062-72.
21. Haraldsen G, Kvale D, Lien B, Farstad IN, Brandtzaeg P. Cytokine-regulated expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human microvascular endothelial cells. *J Immunol.* 1996; **156**(7): 2558-65.
22. McDouall RM, Batten P, McCormack A, Yacoub MH, Rose ML. MHC class II expression on human heart microvascular endothelial cells: exquisite sensitivity to interferon-gamma and natural killer cells. *Transplantation.* 1997; **64**(8): 1175-80.
23. Lidington EA, Moyes DL, McCormack AM, Rose ML. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl Immunol.* 1999; **7**(4): 239-46.
24. Rose ML. Endothelial cells as antigen-presenting cells: role in human transplant rejection. *Cell Mol Life Sci.* 1998; **54**(9): 965-78.
25. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002; **11**(1): 81-90.
26. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 1996; **272**(5258): 60-6.
27. Zhu DZ, Cheng CF, Pauli BU. Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; **88**(21): 9568-72.
28. Pauli BU, Lee CL. Organ preference of metastasis. The role of organ-specifically modulated endothelial cells. *Lab Invest.* 1988; **58**(4): 379-87.
29. Pober JS. Endothelial activation: intracellular signaling pathways. *Arthritis Res.* 2002; **4**(3Suppl): S109-16.
30. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998; **338**(7): 436-45.
31. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol.* 1994; **55**(5): 662-75.

32. Biedermann BC. Vascular endothelium: checkpoint for inflammation and immunity. *News Physiol Sci.* 2001; **16**: 84-8.
33. Bartholdy C, Marker O, Thomsen AR. Migration of activated CD8(+) T lymphocytes to sites of viral infection does not require endothelial selectins. *Blood.* 2000; **95**(4): 1362-9.
34. Briscoe DM, Cotran RS, Pober JS. Effects of tumor necrosis factor, lipopolysaccharide, and IL-4 on the expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vivo. Correlation with CD3+T cell infiltration. *J Immunol.* 1992; **149**(9): 2954-60.
35. Doukas J, Pober JS. IFN-gamma enhances endothelial activation induced by tumor necrosis factor but not IL-1. *J Immunol.* 1990; **145**(6): 1727-33.
36. Thornhill MH, Wellicome SM, Mahiouz DL, Lanchbury JS, Kyan-Aung U, Haskard DO. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J Immunol.* 1991; **146**(2): 592-8.
37. Austrup F, Vestweber D, Borges E, Lohning M, Brauer R, Herz U, Renz H, Hallmann R, Scheffold A, Radbruch A, Hamann A. P- and E selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature.* 1997; **385**: 81-83.
38. Heidemann J, Domschke W, Kucharzik T, Maaser C. Intestinal microvascular endothelium and innate immunity in inflammatory bowel disease: a second line of defense? *Infect Immun.* 2006; **74**(10): 5425-32.
39. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002; **105**(10): 1158-61.
40. Dunzendorfer S, Lee HK, Tobias PS. Flow-dependent regulation of endothelial Toll-like receptor 2 expression through inhibition of SP1 activity. *Circ Res.* 2004; **95**(7): 684-91.
41. Middleton J, Americh L, Gayon R, Julien D, Aguilar L, Amalric F, Girard JP. Endothelial cell phenotypes in the rheumatoid synovium: activated, angiogenic, apoptotic and leaky. *Arthritis Res Ther.* 2004; **6**(2): 60-72.
42. Szekanecz Z, Koch AE. Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2004; **30**(1): 97-114.
43. Andjelkovic AV, Pachter JS. Central nervous system endothelium in neuroinflammatory, neuroinfectious, and neurodegenerative disease. *J Neurosci Res.* 1998; **51**(4): 423-30.
44. Deban L, Correale C, Vetrano S, Malesci A, Danese S. Multiple pathogenic roles of microvasculature in inflammatory bowel disease: a Jack of all trades. *Am J Pathol.* 2008; **172**(6): 1457-66.
45. Muehlhoefer A, Saubermann LJ, Gu X, Luedtke-Heckenkamp K, Xavier R, Blumberg RS, Podolsky DK, MacDermott RP, Reinecker HC. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol.* 2000; **164**(6): 3368-76.
46. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes.* 1994; **43**(11): 1271-8.

47. Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A. Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem*. 1993; **268**(35): 26055-8.
48. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006; **116**(7): 1793-801.
49. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006; **6**(10): 772-83.
50. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; **420**(6917): 868-74.
51. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- $\kappa$ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J*. 1995; **9**(10): 899-909.
52. Libby P. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis. *Am J Med*. 2008; **121**(10 Suppl 1): S21-31.
53. Douni E, Akassoglou K, Alexopoulou L, Georgopoulos S, Haralambous S, Hill S, Kassiotis G, Kontoyiannis D, Pasparakis M, Plows D, Probert L, Kollias G. Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis. *J Inflamm*. 1995; **47**(1-2): 27-38.
54. Feldmann M, Maini RN, Bondeson J, Taylor P, Foxwell BM, Brennan FM. Cytokine blockade in rheumatoid arthritis. *Adv Exp Med Biol*. 2001; **490**: 119-27.
55. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor- $\kappa$ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997; **336**(15): 1066-71.
56. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 1997; **9**(2): 240-6.
57. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001; **11**(9): 372-7.
58. Baldwin AS Jr. The NF- $\kappa$ B and I  $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996; **14**: 649-83.
59. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000; **18**: 621-63.
60. Schindler U, Baichwal VR. Three NF- $\kappa$ B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced expression. *Mol Cell Biol*. 1994; **14**(9): 5820-31.
61. Shu HB, Agranoff AB, Nabel EG, Leung K, Duckett CS, Neish AS, Collins T, Nabel GJ. Differential regulation of vascular cell adhesion molecule 1 gene expression by specific NF- $\kappa$ B subunits in endothelial and epithelial cells. *Mol Cell Biol*. 1993; **13**(10): 6283-9.
62. Parry GC, Mackman N. A set of inducible genes expressed by activated human monocytic and endothelial cells contain  $\kappa$ B-like sites that specifically bind c-Rel-p65 heterodimers. *J Biol Chem*. 1994; **269**(33): 20823-5.
63. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001; **11**(9): 372-7.
64. Slowik MR, De Luca LG, Fiers W, Pober JS. Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration. *Am J Pathol*. 1993; **143**(6): 1724-30.



65. Bradley JR, Thiru S, Pober JS. Disparate localization of 55-kd and 75-kd tumor necrosis factor receptors in human endothelial cells. *Am J Pathol.* 1995; **146**(1): 27-32.
66. Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem.* 1993; **268**(25): 18542-8.
67. Holtmann MH, Neurath MF. Differential TNF-signaling in chronic inflammatory disorders. *Curr Mol Med.* 2004; **4**(4): 439-44.
68. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* 2004; **202**: 8-32.
69. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol.* 2004; **75**(2): 163-89.
70. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 2003; **22**(10): 556-60.
71. Kotenko SV, Izotova LS, Pollack BP, Mariano TM, Donnelly RJ, Muthukumar G, Cook JR, Garotta G, Silvennoinen O, Ihle JN, et al. Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex. *J Biol Chem.* 1995; **270**(36): 20915-21.
72. Ealick SE, Cook WJ, Vijay-Kumar S, Carson M, Nagabhushan TL, Trotta PP, Bugg CE. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science.* 1991; **252**(5006): 698-702.
73. Lillemeier BF, Köster M, Kerr IM. STAT1 from the cell membrane to the DNA. *EMBO J.* 2001; **20**(10): 2508-17.
74. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986; **136**(7): 2348-57.
75. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today.* 1997; **18**(6): 263-6.
76. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008; **112**(5): 1557-69.
77. Kurts C. Th17 cells: a third subset of CD4+ T effector cells involved in organ-specific autoimmunity. *Nephrol Dial Transplant.* 2008; **23**(3): 816-9.
78. Rotondi M, Chiovato L, Romagnani S, Serio M, Romagnani P. Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. *Endocr Rev.* 2007; **28**(5): 492-520.
79. Rotondi M, Lazzeri E, Romagnani P, Serio M. Role for interferon-gamma inducible chemokines in endocrine autoimmunity: an expanding field. *J Endocrinol Invest.* 2003; **26**(2): 177-80.
80. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000; **12**(2): 121-7.
81. Zhao DX, Hu Y, Miller GG, Luster AD, Mitchell RN, Libby P. Differential expression of the IFN-gamma-inducible CXCR3-binding chemokines, IFN-inducible protein 10, monokine induced by IFN, and IFN-inducible T cell alpha chemoattractant in human cardiac allografts: association with cardiac allograft vasculopathy and acute rejection. *J Immunol.* 2002; **169**(3): 1556-60.

82. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med*. 1998; **187**(1): 129-34.
83. Annunziato F, Cosmi L, Galli G, Beltrame C, Romagnani P, Manetti R, Romagnani S, Maggi E. Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*. 1999; **65**(5): 691-9.
84. Romagnani P, Beltrame C, Annunziato F, Lasagni L, Luconi M, Galli G, Cosmi L, Maggi E, Salvadori M, Pupilli C, Serio M. Role for interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 1999; **10**(12): 2518-26.
85. Bonacchi A, Romagnani P, Romanelli RG, Efsen E, Annunziato F, Lasagni L, Francalanci M, Serio M, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P, Marra F. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem*. 2001; **276**(13): 9945-54.
86. Romagnani P, Annunziato F, Lasagni L, Lazzeri E, Beltrame C, Francalanci M, Uguccioni M, Galli G, Cosmi L, Maurenzig L, Baggiolini M, Maggi E, Romagnani S, Serio M. Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest*. 2001; **107**(1): 53-63.
87. Campbell JD, Gangur V, Simons FE, HayGlass KT. Allergic humans are hyporesponsive to a CXCR3 ligand-mediated Th1 immunity-promoting loop. *FASEB J*. 2004; **18**(2): 329-31.
88. Romagnani P, Maggi L, Mazzinghi B, Cosmi L, Lasagni L, Liotta F, Lazzeri E, Angeli R, Rotondi M, Filì L, Parronchi P, Serio M, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; **116**(6): 1372-9.
89. G. Gambaro, L. Bonfante, S. Sasso, M.G. Tabbì, N. Baldan, A. Antonello, P. Rigotti, A. D'Angelo. Vasculopatia cronica del trapianto e rigetto cronico di rene. *Giornale Italiano di Nefrologia*. 2001; **18**(2) :201-7.
90. Hauser IA, Spiegler S, Kiss E, Gauer S, Sichler O, Scheuermann EH, Ackermann H, Pfeilschifter JM, Geiger H, Gröne HJ, Radeke HH. Prediction of acute renal allograft rejection by urinary monokine induced by IFN-gamma (MIG). *J Am Soc Nephrol*. 2005; **16**(6): 1849-58.
91. Melter M, Exeni A, Reinders ME, Fang JC, McMahon G, Ganz P, Hancock WW, Briscoe DM. Expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand IP-10 during human cardiac allograft rejection. *Circulation*. 2001; **104**(21): 2558-64.
92. Fahmy NM, Yamani MH, Starling RC, Ratliff NB, Young JB, McCarthy PM, Feng J, Novick AC, Fairchild RL. Chemokine and chemokine receptor gene expression indicates acute rejection of human cardiac transplants. *Transplantation*. 2003; **75**(1): 72-8.
93. Segerer S, Cui Y, Eitner F, Goodpaster T, Hudkins KL, Mack M, Cartron JP, Colin Y, Schlondorff D, Alpers CE. Expression of chemokines and chemokine receptors during human renal transplant rejection. *Am J Kidney Dis*. 2001; **37**(3): 518-31.
94. Hancock WW, Lu B, Gao W, Csizmadia V, Faia K, King JA, Smiley ST, Ling M, Gerard NP, Gerard C. Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection. *J Exp Med*. 2000; **192**(10): 1515-20.

95. Zhang Z, Kaptanoglu L, Haddad W, Ivancic D, Alnadjim Z, Hurst S, Tishler D, Luster AD, Barrett TA, Fryer J. Donor T cell activation initiates small bowel allograft rejection through an IFN-gamma-inducible protein-10-dependent mechanism. *J Immunol.* 2002; **168**(7): 3205-12.
96. van Loosdregt J, van Oosterhout MF, Bruggink AH, van Wichen DF, van Kuik J, de Koning E, Baan CC, de Jonge N, Gmelig-Meyling FH, de Weger RA. The chemokine and chemokine receptor profile of infiltrating cells in the wall of arteries with cardiac allograft vasculopathy is indicative of a memory T-helper 1 response. *Circulation.* 2006; **114**(15): 1561-4.
97. Akalin E, Dikman S, Murphy B, Bromberg JS, Hancock WW. Glomerular infiltration by CXCR3+ ICOS+ activated T cells in chronic allograft nephropathy with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant.* 2003; **3**(9):1116-20.
98. Hauser IA, Spiegler S, Kiss E, Gauer S, Sichler O, Scheuermann EH, Ackermann H, Pfeilschifter JM, Geiger H, Gröne HJ, Radeke HH. Prediction of acute renal allograft rejection by urinary monokine induced by IFN-gamma (MIG). *J Am Soc Nephrol.* 2005; **16**(6): 1849-58.
99. Karason K, Jernås M, Hägg DA, Svensson PA. Evaluation of CXCL9 and CXCL10 as circulating biomarkers of human cardiac allograft rejection. *BMC Cardiovasc Disord.* 2006; **6**:29.
100. Rotondi M, Rosati A, Buonamano A, Lasagni L, Lazzeri E, Pradella F, Fossombroni V, Cirami C, Liotta F, La Villa G, Serio M, Bertoni E, Salvadori M, Romagnani P. High pretransplant serum levels of CXCL10/IP-10 are related to increased risk of renal allograft failure. *Am J Transplant.* 2004; **4**(9): 1466-74.
101. García-López MA, Sancho D, Sánchez-Madrid F, Marazuela M. Thyrocytes from autoimmune thyroid disorders produce the chemokines IP-10 and Mig and attract CXCR3+ lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; **86**(10): 5008-16.
102. Romagnani P, Rotondi M, Lazzeri E, Lasagni L, Francalanci M, Buonamano A, Milani S, Vitti P, Chiovato L, Tonacchera M, Bellastella A, Serio M. Expression of IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 in the thyroid and increased levels of IP-10/CXCL10 in the serum of patients with recent-onset Graves' disease. *Am J Pathol.* 2002; **161**(1): 195-206.
103. Aust G, Sittig D, Steinert M, Lamesch P, Lohmann T. Graves' disease is associated with an altered CXCR3 and CCR5 expression in thyroid-derived compared to peripheral blood lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 2002; **127**(3): 479-85.
104. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997; **385**(6617): 640-4.
105. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; **24**(1): 34-40.
106. Fraticelli P, Sironi M, Bianchi G, D'Ambrosio D, Albanesi C, Stoppacciaro A, Chieppa M, Allavena P, Ruco L, Girolomoni G, Sinigaglia F, Vecchi A, Mantovani A. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest.* 2001; **107**(9): 1173-81.
107. Robinson LA, Nataraj C, Thomas DW, Howell DN, Griffiths R, Bautch V, Patel DD, Feng L, Coffman TM. A role for fractalkine and its receptor (CX3CR1) in cardiac allograft rejection. *J Immunol.* 200; **165**(11): 6067-72.

108. Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol*. 2001; **169**(3): 453-9.
109. LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, Tomas E. Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; **291**(1): E175-81.
110. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*. 2005; **51**(2): 85-94.
111. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation: from basic science to clinical applications. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003; **27**(Suppl 3): S41-5.
112. Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol*. 2004; **5**(7): 419-29.
113. Varga T, Nagy L. Nuclear receptors, transcription factors linking lipid metabolism and immunity: the case of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Eur J Clin Invest*. 2008; **38**(10): 695-707.
114. Touyz RM, Schiffrin EL. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol*. 2006; **45**(1): 19-28.
115. Papageorgiou E, Pitulis N, Msaouel P, Lembessis P, Koutsilieris M. The non-genomic crosstalk between PPAR-gamma ligands and ERK1/2 in cancer cell lines. *Expert Opin Ther Targets*. 2007; **11**(8):1071-85.
116. Burgermeister E, Seger R. PPARgamma and MEK Interactions in Cancer. *PPAR Res*. 2008; **2008**: 309469.
117. Chen F, Wang M, O'Connor JP, He M, Tripathi T, Harrison LE. Phosphorylation of PPARgamma via active ERK1/2 leads to its physical association with p65 and inhibition of NF-kappabeta. *J Cell Biochem*. 2003; **90**(4): 732-44.
118. Burgermeister E, Seger R. MAPK kinases as nucleo-cytoplasmic shuttles for PPARgamma. *Cell Cycle*. 2007; **6**(13): 1539-48.
119. Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, Iino N, Takeshita A. 15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones activate the MEK/ERK pathway through phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2001; **276**(52): 48950-5.
120. Scatena R, Bottoni P, Martorana GE, Ferrari F, De Sole P, Rossi C, Giardina B. Mitochondrial respiratory chain dysfunction, a non-receptor-mediated effect of synthetic PPAR-ligands: biochemical and pharmacological implications. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; **319**(3): 967-73.
121. Gurnell M. PPARgamma and metabolism: insights from the study of human genetic variants. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2003; **59**(3): 267-77.
122. Giannini S, Serio M, Galli A. Pleiotropic effects of thiazolidinediones: taking a look beyond antidiabetic activity. *J Endocrinol Invest*. 2004; **27**(10): 982-91.
123. Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*. 2004; **351**(11): 1106-18.
124. Castrillo A, Díaz-Guerra MJ, Hortelano S, Martín-Sanz P, Boscá L. Inhibition of IkappaB kinase and IkappaB phosphorylation by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol*. 2000; **20**(5): 1692-8.

125. Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; **97**(9): 4844-9.
126. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med*. 2001; **7**(1): 48-52.
127. Galli A, Ceni E, Crabb DW, Mello T, Salzano R, Grappone C, Milani S, Surrenti E, Surrenti C, Casini A. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit invasiveness of pancreatic cancer cells via PPARgamma independent mechanisms. *Gut*. 2004; **53**(11): 1688-97.
128. Yang YC, Ho TC, Chen SL, Lai HY, Wu JY, Tsao YP. Inhibition of cell motility by troglitazone in human ovarian carcinoma cell line. *BMC Cancer*. 2007; **7**: 216.
129. Sarraf P, Mueller E, Smith WM, Wright HM, Kum JB, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Spiegelman BM, Eng C. Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell*. 1999; **3**(6): 799-804.
130. Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science*. 2000; **289**(5483): 1357-60.
131. Elnemr A, Ohta T, Iwata K, Ninomia I, Fushida S, Nishimura G, Kitagawa H, Kayahara M, Yamamoto M, Terada T, Miwa K. PPARgamma ligand (thiazolidinedione) induces growth arrest and differentiation markers of human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol*. 2000; **17**(6): 1157-64.
132. Panigrahy D, Singer S, Shen LQ, Butterfield CE, Freedman DA, Chen EJ, Moses MA, Kilroy S, Duensing S, Fletcher C, Fletcher JA, Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J, Kaipainen A. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest*. 2002; **110**(7): 923-32.
133. Girnun GD, Naseri E, Vafai SB, Qu L, Szwaya JD, Bronson R, Alberta JA, Spiegelman BM. Synergy between PPARgamma ligands and platinum-based drugs in cancer. *Cancer Cell*. 2007; **11**(5): 395-406.
134. Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*. 2004; **4**(1): 61-70.
135. Galli A, Mello T, Ceni E, Surrenti E, Surrenti C. The potential of antidiabetic thiazolidinediones for anticancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*. 2006; **15**(9): 1039-49.
136. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998; **391**(6662): 82-6.
137. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998; **391**(6662): 79-82.
138. Zhang X, Young HA. Inhibition of biological functions of natural killer cells by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2 through PPAR-gamma-dependent and -independent mechanism. *FA-SEB J*. 2002; **16**(5PtII): A1082.
139. Gosset P, Charbonnier AS, Delerive P, Fontaine J, Staels B, Pestel J, Tonnel AB, Trottein F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2001; **31**(10): 2857-65.

140. Marx N, Mach F, Sauty A, Leung JH, Sarafi MN, Ransohoff RM, Libby P, Plutzky J, Luster AD. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells. *J Immunol.* 2000; **164**(12): 6503-8.
141. Antonelli A, Rotondi M, Ferrari SM, Fallahi P, Romagnani P, Franceschini SS, Serio M, Ferrannini E. Interferon-gamma-inducible alpha-chemokine CXCL10 involvement in Graves' ophthalmopathy: modulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; **91**(2): 614-20.
142. Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Maffia P, Patel NS, Di Paola R, Ialenti A, Genovese T, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP, Thiemermann C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2004; **483**(1): 79-93.
143. Mohanty P, Aljada A, Ghanim H, Hofmeyer D, Tripathy D, Syed T, Al-Haddad W, Dhindsa S, Dandona P. Evidence for a potent antiinflammatory effect of rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; **89**(6): 2728-35.
144. Bierman EL. George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb.* 1992; **12**(6): 647-56.
145. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med.* 2007; **356**(24): 2457-71.
146. Szatmari I, Töröcsik D, Agostini M, Nagy T, Gurnell M, Barta E, Chatterjee K, Nagy L. PPARgamma regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. *Blood.* 2007; **110**(9): 3271-80.
147. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; **72**: 248-54.
148. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; **227**: 680-5.
149. De Lean A, Munson PJ, Rodbard D. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: Applications to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am J Physiol.* 1978; **235**: E97-102.
150. Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol.* 1993; **11**: 767-804.
151. Galli A, Crabb D W, Ceni E, Salzano R, Mello T, Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Trozzi L, Surrenti C, Casini A. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology.* 2002; **122**: 1924-40.
152. Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, Cobb JE, Collins JL, Consler TG, Davis RG, Hull-Ryde EA, Lenhard JM, Patel L, Plunket KD, Shenk JL, Stimmel JB, Therapontos C, Willson TM, Blanchard SG. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry.* 2002; **41**(21): 6640-50.
153. Sana TR, Janatpour MJ, Sathe M, McEvoy LM, McClanahan TK. Microarray analysis of primary endothelial cells challenged with different inflammatory and immune cytokines. *Cytokine.* 2005; **29**(6): 256-69.
154. Rotondi M, Falorni A, De Bellis A, Laureti S, Ferruzzi P, Romagnani P, Buonamano A, Lazzeri E, Crescioli C, Mannelli M, Santeusano F, Bellastella A, Serio M. Elevated serum interferon-gamma-inducible chemokine-10/CXC chemokine ligand-

- 10 in autoimmune primary adrenal insufficiency and in vitro expression in human adrenal cells primary cultures after stimulation with proinflammatory cytokines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; **90**: 2357-63.
155. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol.* 2002; **20**: 55-72.
156. Wong CK, Tsang CM, Ip WK, Lam CW. Molecular mechanisms for the release of chemokines from human leukemic mast cell line (HMC)-1 cells activated by SCF and TNF-alpha: roles of ERK, p38 MAPK, and NF-kappaB. *Allergy.* 2006; **61**(3): 289-97.
157. Kanda N, Watanabe S. Histamine inhibits the production of interferon-induced protein of 10 kDa in human squamous cell carcinoma and melanoma. *J Invest Dermatol.* 2002; **119**(6): 1411-9.
158. Sasaki M, Jordan P, Welbourne T, Minagar A, Joh T, Itoh M, Elrod JW, Alexander JS. Troglitazone, a PPAR-gamma activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF-alpha. *BMC Physiol.* 2005; **5**(1): 3.
159. Chen S, Hu Z, Zhang K. Effect of Troglitazone on expression of adhesion molecules and eNOS in human saphenous vein graft. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2007; **27**(6):657-9.
160. Aljada A, Garg R, Ghanim H, Mohanty P, Hamouda W, Assian E, Dandona P. Nuclear factor-kappaB suppressive and inhibitor-kappaB stimulatory effects of troglitazone in obese patients with type 2 diabetes: evidence of an antiinflammatory action? *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; **86**(7): 3250-6.
161. Hetzel J, Balletshofer B, Rittig K, Walcher D, Kratzer W, Hombach V, Häring HU, Koenig W, Marx N. Rapid effects of rosiglitazone treatment on endothelial function and inflammatory biomarkers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; **25**(9): 1804-9.
162. Konrad D, Rudich A, Bilan PJ, Patel N, Richardson C, Witters LA, Klip A. Troglitazone causes acute mitochondrial membrane depolarisation and an AMPK-mediated increase in glucose phosphorylation in muscle cells. *Diabetologia.* 2005; **48**(5): 954-66.
163. Chen L, Necela BM, Su W, Yanagisawa M, Anastasiadis PZ, Fields AP, Thompson EA.. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes epithelial to mesenchymal transformation by Rho GTPase-dependent activation of ERK1/2. *J Biol Chem.* 2006; **281**(34): 24575-87.
164. Brunmair B, Gras F, Neschen S, Roden M, Wagner L, Waldhäusl W, Fürnsinn C. Direct thiazolidinedione action on isolated rat skeletal muscle fuel handling is independent of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated changes in gene expression. *Diabetes.* 2001; **50**(10): 2309-15.
165. von Knethen A, Soller M, Tzieply N, Weigert A, Johann AM, Jennewein C, Köhl R, Brüne B. PPARgamma1 attenuates cytosol to membrane translocation of PKCalpha to desensitize monocytes/macrophages. *J Cell Biol.* 2007; **176**(5): 681-94.
166. Bai YP, Liu YH, Chen J, Song T, You Y, Tang ZY, Li YJ, Zhang GG. Rosiglitazone attenuates NF-kappaB-dependent ICAM-1 and TNF-alpha production caused by homocysteine via inhibiting ERK1/2/p38MAPK activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; **360**(1): 20-6.
167. Appel S, Mirakaj V, Bringmann A, Weck MM, Grünebach F, Brossart P. PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells via the MAP kinase and NF-kappaB pathways. *Blood.* 2005; **106**(12): 3888-94.

168. Burgermeister, E., Chuderland, D., Hanoch, T., Meyer, M., Liscovitch, M., and Seger, R. Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Cell. Biol.* 2007; **27**: 803-17
169. Bishop-Bailey D, Hla T, Warner TD. Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) is a PPARgamma agonist in an ECV304 cell line. *Br J Pharmacol.* 2000; **131**(4): 651-4.
170. Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, Hiramatsu R, Serhan CN, Spiegelman BM. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2000; **275**(3): 1873-7.
171. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol.* 2006; **72**(11): 1605-21.
172. Lee SJ, Namkoong S, Kim YM, Kim CK, Lee H, Ha KS, Chung HT, Kwon YG, Kim YM. Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf-1/MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; **291**(6): H2836-46.
173. Robinson LA, Nataraj C, Thomas DW, Howell DN, Griffiths R, Bautch V, Patel DD, Feng L, Coffman TM. A role for fractalkine and its receptor (CX3CR1) in cardiac allograft rejection. *J Immunol.* 2000; **165**(11): 6067-72.
174. Lazzeri E, Rotondi M, Mazzinghi B, Lasagni L, Buonamano A, Rosati A, Pradella F, Fossombroni V, La Villa G, Gacci M, Bertoni E, Serio M, Salvadori M, Romagnani P. High CXCL10 expression in rejected kidneys and predictive role of pretransplant serum CXCL10 for acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Transplantation.* 2005; **79**(9): 1215-20.
175. Hancock WW, Gao W, Csizmadia V, Faia KL, Shemmeri N, Luster AD. Donor-derived IP-10 initiates development of acute allograft rejection. *J Exp Med.* 2001; **193**(8): 975-80.
176. Haskell CA, Hancock WW, Salant DJ, Gao W, Csizmadia V, Peters W, Faia K, Fituri O, Rottman JB, Charo IF. Targeted deletion of CX(3)CR1 reveals a role for fractalkine in cardiac allograft rejection. *J Clin Invest.* 2001; **108**(5): 679-88.
177. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest.* 1999; **104**(8): 1041-50.
178. Meisner F, Walcher D, Gizard F, Kapfer X, Huber R, Noak A, Sunder-Plassmann L, Bach H, Haug C, Bachem M, Stojakovic T, März W, Hombach V, Koenig W, Staels B, Marx N. Effect of rosiglitazone treatment on plaque inflammation and collagen content in nondiabetic patients: data from a randomized placebo-controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; **26**(4): 845-50.
179. Kosuge H, Haraguchi G, Koga N, Maejima Y, Suzuki J, Isobe M. Pioglitazone prevents acute and chronic cardiac allograft rejection. *Circulation.* 2006; **113**(22): 2613-22.
180. Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, Gomis R, Hanefeld M, Jones NP, Komajda M, McMurray JJ; RECORD Study Group. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes--an interim analysis. *N Engl J Med.* 2007; **357**(1): 28-38.
181. Chiarelli F, Di Marzio D. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists and diabetes: current evidence and future perspectives. *Vasc Health Risk Manag.* 2008; **4**(2): 297-304.
182. Psaty BM, Furberg CD. Rosiglitazone and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2007; **356**(24): 2522-4



183. Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA. Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *J Biol Chem.* 1997; **272**(23): 14899-907.
184. Sanceau J, Kaisho T, Hirano T, Wietzerbin J. Triggering of the human interleukin-6 gene by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in monocytic cells involves cooperation between interferon regulatory factor-1, NF kappa B, and Sp1 transcription factors. *J Biol Chem.* 1995; **270**(46): 27920-31.
185. Sims SH, Cha Y, Romine MF, Gao PQ, Gottlieb K, Deisseroth AB. A novel interferon-inducible domain: structural and functional analysis of the human interferon regulatory factor 1 gene promoter. *Mol Cell Biol.* 1993; **13**(1): 690-702.
186. Harada H, Takahashi E, Itoh S, Harada K, Hori TA, Taniguchi T. Structure and regulation of the human interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 genes: implications for a gene network in the interferon system. *Mol Cell Biol.* 1994; **14**(2): 1500-9.
187. Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci.* 2005; **118**(Pt 14): 2997-3002.
188. Harding A, Tian T, Westbury E, Frische E, Hancock JF. Subcellular localization determines MAP kinase signal output. *Curr Biol.* 2005; **15**(9): 869-73.
189. Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; **40**(12): 2707-19.
190. Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature.* 1985; **318**(6047): 665-7.
191. Crescioli C, Cosmi L, Borgogni E, Santarlasci V, Gelmini S, Sottili M, Sarchielli E, Mazzinghi B, Francalanci M, Pezzatini A, Perigli G, Vannelli GB, Annunziato F, Serio M. Methimazole inhibits CXC chemokine ligand 10 secretion in human thyrocytes. *Endocrinol.* 2007; **195**(1): 145-55.
192. Sanceau J, Merlin G, Wietzerbin J. Tumor necrosis factor-alpha and IL-6 up-regulate IFN-gamma receptor gene expression in human monocytic THP-1 cells by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Immunol.* 1992; **149**(5): 1671-5.
193. Krakauer T, Oppenheim JJ. IL-1 and tumor necrosis factor-alpha each up-regulate both the expression of IFN-gamma receptors and enhance IFN-gamma-induced HLA-DR expression on human monocytes and a human monocytic cell line (THP-1). *J Immunol.* 1993; **150**(4): 1205-11.

## A New Mechanism Involving ERK Contributes to Rosiglitazone Inhibition of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ and Interferon- $\gamma$ Inflammatory Effects in Human Endothelial Cells

Adriana Lombardi, Giulia Cantini, Elisabetta Piscitelli, Stefania Gelmini, Michela Francalanci, Tommaso Mello, Elisabetta Ceni, Gabriele Varano, Gianni Forti, Mario Rotondi, Andrea Galli, Mario Serio, Michaela Luconi

**Objective**—Microvascular endothelium is one of the main targets of the inflammatory response. On specific activation, endothelial cells recruit Th1-lymphocytes at the inflammatory site. We investigated the intracellular signaling mediating tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interferon (IFN)- $\gamma$  inflammatory response in human microvascular endothelial cells (HMEC-1) and the interfering effects of the peroxisome-proliferator-activated-receptor (PPAR $\gamma$ ) agonist, rosiglitazone (RGZ).

**Methods and Results**—TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ , mainly when combined, stimulate IFN $\gamma$ -inducible protein of 10 kDa (IP10) and fractalkine production evaluated by ELISA and TaqMan analyses. This effect is not only mediated by activation of the NF $\kappa$ B and Stat1 classic pathways, but also involves a rapid increase in phosphorylation and activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) as measured by Western blot. RGZ interferes with TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  stimulation of IP10, fractalkine, and adhesion molecule through a novel rapid mechanism which involves the blocking of ERK activation.

**Conclusions**—Our findings shed new light on the mechanisms underlying the inflammatory response of microvascular endothelium and on the possible therapeutic use of RGZ in vasculopathies involving Th1-responses. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:718-724)

**Key Words:** thiazolidinediones ■ MAPK ■ CXCL10 ■ endothelium ■ Th1-response

Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interferon (IFN)- $\gamma$  are the pivotal cytokines coordinating interactions between infiltrating lymphocytes/macrophages and resident cells during the vascular inflammatory Th1-response. Th1-oriented immune responses are implicated in several systemic pathologies such as autoimmune diseases, atherogenesis, type 2 diabetes (T2D), and they also play a major role in the development of acute and chronic rejection as well as in chronic allograft nephropathy.<sup>1</sup> IFN $\gamma$ , primarily secreted by activated T-lymphocytes, represents the cardinal Th1-cytokine whereas TNF $\alpha$ , secreted by monocytes, macrophages, and resident cells, is considered a pleiotropic cytokine involved in a general inflammatory response. Both cytokines modulate the expression of cellular adhesion molecules (CAM) in endothelial cells (ECs). A synergistic action of TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  in promoting inflammatory response through chemokine secretion has been described.<sup>2</sup> In particular, IFN $\gamma$  induces ECs to secrete CXC chemokines, such as

fractalkine, IFN $\gamma$ -inducible T-cell  $\alpha$ -chemoattractant, monokine-induced by IFN $\gamma$  and IFN $\gamma$ -inducible protein of 10 kDa (IP10). Both IP10 and fractalkine chemoattractant activity is directed toward Th1-lymphocytes.<sup>1,3</sup>

Thiazolidinediones (TZD) are a pharmacological class of drugs currently used in T2D to improve glucose homeostasis by increasing insulin sensitivity. Besides their well established effects on lipid metabolism and glucose homeostasis, a novel role of TZD in regulating the inflammatory response<sup>4</sup> through a direct action on cells of natural and induced immunity is recently emerging, both in vitro and in animal models of human inflammatory disorders.<sup>5,6</sup> Experimental evidence suggests that the TZD receptor, PPAR $\gamma$ , interferes with cytokine-induced chemokine secretion in monocytes,<sup>7</sup> macrophages,<sup>8</sup> and venous endothelial cells.<sup>9</sup> TZD action seems to be mainly attributable to their ability to bind PPAR $\gamma$ , a member of the nuclear hormone receptor family, which acts on specific responsive elements of genes involved

---

Original received July 24, 2007; final version accepted January 10, 2008.

From the DENOth Center of Excellence for Research, Transfer and High Education; Department of Clinical Physiopathology (A.L., G.C., E.P., S.G., M.F., T.M., E.C., G.V., G.F., M.R., A.G., M.S., M.L.), University of Florence; and the Unit of Internal Medicine and Endocrinology (M.R.), Fondazione Salvatore Maugeri I.R.C.C.S., Pavia, Italy.

Correspondence to Michaela Luconi, Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Florence, Italy. E-mail m.luconi@dfc.unifi.it

© 2008 American Heart Association, Inc.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.160713

## ORIGINAL ARTICLE

The Y606C *RET* mutation causes a receptor gain of function

T. Ercolino\*, A. Lombardi\*, L. Becherini, E. Piscitelli, G. Cantini, M. S. Gaglianò, M. Serio, M. Luconi and M. Mannelli

DENCOThe Center of Excellence for Research, Transfer and High Education, Section of Endocrinology, Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Florence, Italy

## Summary

**Context** Medullary thyroid carcinoma (MTC) is the most common feature of multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN2A) and occurs in almost all patients affected by germline *RET* mutations. **Objective** We identified and characterized an activating germline *RET* point mutation (G>A substitution leading to the heterozygous missense mutation Y606C in exon 10), in a 58-year-old female affected by MTC.

**Design** The *RET*/Y606C and *RET*/C620Y, obtained by site-directed mutagenesis, as well as the *RET*/wild-type (wt) were cloned in an expression vector and transiently transfected in NIH3T3 fibroblasts. *In vitro* cell model was used to evaluate the effect of Y606C mutation on the *RET* downstream signalling pathways through Western blot analysis. **Results** We found that the cysteine insertion, due to the Y606C mutation, results in increased receptor dimerization, which is accompanied by an increased tyrosine phosphorylation of the Y905 residue in the *RET*/Y606C, demonstrating that the Y606C mutation is associated with constitutive receptor activation. As *RET* activation results in an intracellular signalling cascade involving extracellular signal-regulated kinases (ERKs), we investigated ERK activity in our transfected cells. Results demonstrated a significant increase in ERK2 phosphorylation in the *RET*/Y606C vs. the *RET*/wt and *RET*/C620Y transfected cells, suggesting an up-regulation of *RET* signalling.

**Conclusions** All these findings demonstrate that the Y606C mutation is associated with *RET* constitutive activation and thus has to be considered of pathogenetic relevance in the development of MTC.

(Received 20 September 2007; returned for revision 15 October 2007; finally revised 19 November 2007; accepted 18 January 2008)

## Introduction

The *RET* gene is expressed in neuroendocrine tissues and encodes a tyrosine kinase receptor involved in cellular growth and differentiation.<sup>1,2</sup>

Correspondence: Massimo Mannelli, Department Clinical Physiopathology, University of Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Firenze, Italy.

Tel.: +39 0554271428; Fax: +39 0554271413; E-mail: m.mannelli@dfc.unifi.it

\*These authors contributed equally to this work and they should be regarded as joint First Authors.

© 2008 The Authors

Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd

The extracellular portion of *RET* protein contains four cadherin-like repeats, a calcium binding site and a cysteine-rich domain,<sup>3,4</sup> while its intracellular portion contains a tyrosine kinase domain. Endogenous ligands of *RET* belong to the glial-derived neurotrophic factor (GDNF) family and cause *RET* dimerization, thereby triggering receptor autophosphorylation and activation of the downstream intracellular signalling.<sup>5</sup>

Activating germline point mutations in the *RET* receptor are responsible for three related dominantly inherited cancer syndromes, namely multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN2A), MEN2B and familial medullary thyroid carcinoma (FMTC).<sup>6</sup>

The vast majority of patients affected by MEN2B carries the M918T mutation in the *RET* kinase domain, while most MEN2A and FMTC are caused by germline point mutations affecting cysteines in the extracellular cysteine-rich domain of *RET*.<sup>7–10</sup> Mutations of codon 634 are the most common in MEN2A, while mutations causing FMTC are evenly distributed among the different cysteines (codons 609, 611, 618 and 620) and can also be found in the *RET* kinase domain at codons 768, 790, 791, 804 and 891.<sup>7–10</sup> In particular, among the mutations associated with the FMTC, the *RET*/C620Y has been described as a less strong variant.

Single base pair substitutions in the extracellular cysteine-rich domain result in the replacement of a cysteine residue by another amino acid,<sup>11–15</sup> or more rarely, in the insertion of an additional cysteine residue. These changes lead to a ligand-independent *RET* activation by the formation of covalent disulphide-bonded homodimers.<sup>12–14</sup>

The Y606C mutation has been only once reported in a single patient with medullary thyroid carcinoma (MTC) without any other additional information on her family so that the significance of this mutation is at present unknown.<sup>15</sup>

Herewith, we report the functional *in vitro* studies performed on the Y606C mutation independently found in a 58-year-old female affected by MTC.

## Materials and methods

## Patients

The patient was a 58-year-old female referred to our outpatient clinic after having undergone thyroidectomy for MTC. Her mother had died at the age of 36 years for a liver carcinoma and her father at the age of 45 years for a carcinoma of the pancreas. She has a

Hindawi Publishing Corporation  
PPAR Research  
Volume 2008, Article ID 904041, 11 pages  
doi:10.1155/2008/904041

## Research Article

# Rosiglitazone Inhibits Adrenocortical Cancer Cell Proliferation by Interfering with the IGF-IR Intracellular Signaling

Cantini Giulia,<sup>1</sup> Lombardi Adriana,<sup>1</sup> Piscitelli Elisabetta,<sup>1</sup> Giada Poli,<sup>1</sup> Ceni Elisabetta,<sup>2</sup> Marchiani Sara,<sup>3</sup> Ercolino Tonino,<sup>1</sup> Galli Andrea,<sup>2</sup> Serio Mario,<sup>1</sup> Mannelli Massimo,<sup>1</sup> and Luconi Michaela<sup>1</sup>

<sup>1</sup>DENOfthe Center of Excellence for Research, Transfer and High Education: Section of Endocrinology,

Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Viale Pienacini 6, 50139 Firenze, Italy

<sup>2</sup>DENOfthe Center of Excellence for Research, Transfer and High Education: Section of Gastroenterology,

Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Viale Pienacini 6, 50139 Firenze, Italy

<sup>3</sup>DENOfthe Center of Excellence for Research, Transfer and High Education: Section of Andrology,

Department of Clinical Physiopathology, University of Florence, Viale Pienacini 6, 50139 Firenze, Italy

Correspondence should be addressed to Mannelli Massimo, m.mannelli@dfc.unifi.it

Received 11 March 2008; Revised 21 May 2008; Accepted 9 June 2008

Recommended by Dipak Panigrahy

Rosiglitazone (RGZ), a thiazolidinedione ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- $\gamma$ , has been recently described as possessing antitumoral properties. We investigated RGZ effect on cell proliferation in two cell line models (SW13 and H295R) of human adrenocortical carcinoma (ACC) and its interaction with the signaling pathways of the activated IGF-I receptor (IGF-IR). We demonstrate a high expression of IGF-IR in the two cell lines and in ACC. Cell proliferation is stimulated by IGF-I in a dose- and time-dependent manner and is inhibited by RGZ. The analysis of the main intracellular signaling pathways downstream of the activated IGF-IR, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt, and extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) cascades reveals that RGZ rapidly interferes with the Akt and ERK1/2 phosphorylation/activation which mediates IGF-I stimulated proliferation. In conclusion, our results suggest that RGZ exerts an inhibitory effect on human ACC cell proliferation by interfering with the PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways downstream of the activated IGF-IR.

Copyright © 2008 Cantini Giulia et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. INTRODUCTION

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare tumor with an incidence of approximately 1-2 per million population per year. ACC is a very aggressive tumor, characterized by a poor prognosis: approximately 50% of patients do not survive beyond 2 years from the diagnosis and the 5-year mortality rate is between 20% and 60% [1]. Its poor prognosis depends mainly upon the limited therapeutic resources. At present, a complete surgical removal following an early diagnosis is the only valuable option for the tumor's cure. Moreover, other than improved surgical management, the prognosis for ACC has not changed significantly over the past three decades [2]. The tumor is, in fact, resistant to radio- and chemotherapy and medical treatment very rarely leads to a complete remission in the case of recurrences or metastatic spread. Although several new medical therapeutic options have been recently proposed [3], at present the medical

treatment of advanced ACC is far from being satisfactory, due to our poor knowledge of the molecular mechanisms leading to malignant transformation of adrenocortical cells. In fact, although some intracellular signaling pathways have been shown to be altered in ACC cells [4], efforts to identify the events leading to neoplastic transformation and tumor invasiveness have met with limited success. The role of IGF-I system in mediating proliferation and progression has been well documented in several cancers, including adrenocortical carcinoma [5]. In particular, ACC, as well as the H295R cell line [6], overexpress both IGF-II [7] and its promiscuous receptor IGF-IR [8] in comparison to adrenal adenomas and normal adrenal tissue. The overexpressed IGF-II is thought to act in a paracrine fashion through the IGF-IR to sustain tumor and cell proliferation [6, 9, 10].

Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)- $\gamma$  is a ligand-activated transcription factor and a member of the nuclear hormone receptors superfamily. Thiazolidinediones

## Src activation triggers capacitation and acrosome reaction but not motility in human spermatozoa

Gabriele Varano<sup>1</sup>, Adriana Lombardi<sup>1</sup>, Giulia Cantini<sup>1</sup>, Gianni Forti<sup>1</sup>, Elisabetta Baldi<sup>2</sup> and Michaela Luconi<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Endocrinology Unit, Department of Clinical Physiopathology, DENOTHE Center for Research, Transfer and High Education, University of Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Florence, Italy; <sup>2</sup>Andrology Unit, Department of Clinical Physiopathology, DENOTHE Center for Research, Transfer and High Education, University of Florence, Viale Pieraccini 6, 50139 Florence, Italy

<sup>3</sup>Correspondence address. Tel: +39-055-4271369; Fax: +39-055-4271371; E-mail: m.luconi@dfc.unifi.it

**BACKGROUND:** Protein tyrosine phosphorylation is one of the main processes associated with sperm activation. Although this process and its targets have been well characterized, only few tyrosine kinases have been identified so far and their roles in spermatozoa are still largely unknown. In this study, we report the presence and localization of Src kinase in ejaculated human spermatozoa and investigate its role in regulating the processes underlying sperm activation. **METHODS AND RESULTS:** Specific anti-Src antibodies, against different epitopes of the protein, identified a single band of ~70 kDa relating to a protein which is mainly localized in the post-acrosomal region of the head, neck and midpiece. By immunoprecipitation and immunofluorescence techniques performed with antibodies against Src phosphorylated at Tyr416, which identifies the active kinase, we showed an increased phosphorylation during sperm capacitation. Blocking Src activity with SU6656 resulted in a significant reduction in the protein tyrosine phosphorylation. Moreover, this inhibitor also blocked the progesterone-induced acrosome reaction and interfered with the calcium response to progesterone evaluated in fura-2-loaded spermatozoa. No effect on sperm motility and hyperactivation resulted from incubation with SU6656. **CONCLUSIONS:** We identified a novel Src isoform in human spermatozoa, which appears to be involved in regulating sperm capacitation, calcium fluxes, tyrosine phosphorylation and acrosome reaction.

**Keywords:** tyrosine kinase; sperm; capacitation; acrosome reaction; Src

### Introduction

In order to reach the site of fertilization and to be able to fertilize, ejaculated human spermatozoa need to undergo a series of activating events induced during the sperm transit in the female genital tract, culminating in the process of capacitation, a complex biochemical remodeling of the sperm surface which enables spermatozoa to interact with the zona pellucida glycoproteins surrounding the oocyte (Yanagimachi, 1994). Sperm capacitation is associated with the acquisition of hyperactivation, a peculiar type of motility generating the propulsive forces necessary to penetrate the cumulus oophorus and the zona pellucida vestments of the oocyte (Luconi *et al.*, 2006). The release of the lytic enzymes from the acrosomal vesicle in the sperm head through the acrosome reaction induced by progesterone or by sperm binding to the zona pellucida finally enables the sperm to cross the zona pellucida and interact with the oocyte. All these events can also be induced *in vitro* by incubating spermatozoa in media mimicking the tubal and follicular fluids and are strictly regulated by intracellular signals consisting of post-translational modifications

of key proteins. Indeed, modulation of sperm functions cannot rely on activation or repression of specific master genes, since mature spermatozoa are transcriptionally and translationally silent, due to the high condensation of sperm chromatin and total loss of the translational machinery occurring during spermiogenesis (Yanagimachi, 1994). Phosphorylation and de-phosphorylation of sperm proteins, particularly on tyrosine residues, play a pivotal role among the post-translational regulatory processes (Visconti *et al.*, 2002). Although a great effort has been spent in identifying the protein targets of such modifications (Baker *et al.*, 2007), only a few kinases and phosphatases have been identified and characterized so far. Recently, the tyrosine kinase Src has been proposed as mediating PKA induction of sperm capacitation in the mouse (Baker *et al.*, 2006) and in humans (Lawson *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2008).

The structure and the functional role of human Src in somatic cells have been widely described. Structurally, Src is characterized by several domains in addition to the kinase one (SH1): an SH2 domain, an SH3 domain, an N-terminal

h013/2ee-end/2ee-end/2ee00708/2ee4121-08a	hurtr	S=4	5/9/08	9:35	Art: 08-0078	input-ds
---	-------	-----	--------	------	--------------	----------

0013-7227/08/015.0000  
Printed in U.S.A.Endocrinology 149(7):0000-0000  
Copyright © 2008 by The Endocrine Society  
doi: 10.1210/en.2008-0078

## Q: A Elocalcitol Inhibits Inflammatory Responses in Human Thyroid Cells and T Cells

E. Borgogni,\* E. Sarchielli,\* M. Sottili, V. Santarlasci, L. Cosmi, S. Gelmini, A. Lombardi, G. Cantini, G. Perigli, M. Luconi, G. B. Vannelli, F. Annunziato, L. Adorini, M. Serio, and C. Crescioli

Departments of Clinical Pathophysiology (E.B., M.S., S.G., A.L., G.C., M.L., M.Se., C.C.) and Internal Medicine (V.S., L.C., F.A.), Center for Research Transfer and High Education "DENOTE," Anatomy (E.S., G.B.V.), Histology and Forensic Medicine (G.P.), General Surgery Medical School University of Florence, 6-50139 Florence, Italy; and BioXell (L.A.), 20132 Milan, Italy

Q: B

T-helper 1 (Th1) cell-mediated inflammatory responses predominate in the early pathogenesis of Graves' disease (GD), whereas T-helper 2 (Th2) cell-mediated immunity may play a role in later stages. The chemokine CXCL10 and its receptor CXCR3 are expressed in most thyroid glands of early GD patients. Circulating CXCL10 levels inversely correlate with disease duration; CXCL10 maximal expression also correlates with interferon (IFN) $\gamma$  levels in recent GD onset. Methimazole (MMI) reduces CXCL10 secretion by isolated thyrocytes, decreases serum CXCL10 levels, and promotes a transition from Th1 to Th2 dominance in patients in GD active phase. Vitamin D receptor agonists exhibit antiinflammatory properties and promote tolerance induction. We investigated the effects and the mechanism of action of a nonhypercalcemic vitamin D receptor agonist, elocalcitol (BXL-628), compared with MMI on CXCL10 secretion induced by proinflammatory cytokines.

Furthermore, we studied the effects of both drugs on Th1, T-helper 17, and Th2 cytokine secretion in CD4<sup>+</sup> T cells. ELISA, cytometry, immunocytochemistry, Western blot, and quantitative real-time PCR were used for protein and gene analysis. In human thyrocytes, elocalcitol inhibited IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ -induced CXCL10 protein secretion more potently than MMI. Elocalcitol impaired both cytokines' intracellular pathways, whereas MMI was effective only on the IFN $\gamma$  pathway. In CD4<sup>+</sup> T cells, elocalcitol decreased Th1- and T-helper 17-type cytokines, and promoted Th2-type cytokine secretion. Elocalcitol and MMI inhibited Th1 cytokine-mediated responses in thyrocytes and CD4<sup>+</sup> T cells. In addition, elocalcitol promoted a shift toward a Th2 response. In conclusion, elocalcitol could represent a novel pharmacological tool in the treatment of autoimmune thyroid diseases. (*Endocrinology* 149: 0000-0000, 2008)

AQ: C

AQ: D

ALTHOUGH Graves' disease (GD) has long been considered a T-helper 2 (Th2)-mediated autoimmune disease, a large body of evidence suggests T-helper 1 (Th1) rather than Th2 dominance in its initial phase. The predominant cell pattern involved in GD might, indeed, change throughout the disease course, with Th1 dominance at disease onset, and Th2 later on (1). CXCR3-expressing Th1 lymphocytes and the corresponding ligand, interferon (IFN) $\gamma$ -inducible protein (CXCL10), were detected in the thyroid gland of patients with recent disease onset (2). In addition, CXCL10 serum levels were significantly increased in GD patients at disease initiation (2) and with active Graves' ophthalmopathy (3). CXCL10 is a CXC chemokine inducible by IFN $\gamma$ , as CXCL9 and CXCL11, which controls leukocyte recruitment from blood (4) and is associated with Th1-mediated immune responses (5). In particular, CXCL10 has been

identified as a prototypic chemokine involved in the pathogenesis of glandular autoimmunity (2, 6-9), and the thyroid itself seems the main site of its secretion, perpetuating the Th1-mediated autoimmune cascade in autoimmune thyroid diseases (AITDs) (2, 8, 10-13). In isolated thyrocytes CXCL10 secretion is synergistically sustained by IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  (3, 13, 14), and the mechanism underlying cytokine synergy is linked to a significant up-regulation of IFN $\gamma$  receptor (IFN $\gamma$ R) driven by TNF $\alpha$  (14).

We have previously shown that methimazole (MMI) can revert Th1 cytokine-mediated CXCL10 secretion in thyroid cells by dampening the mechanism underlying cytokine synergy (14). Antithyroid drugs have interfered with immunological signals associated with GD hyperthyroidism (15, 16). In particular, decreased CXCL10 serum levels (17) and a transition from Th1 to Th2 dominance have been reported in hyperthyroid patients with GD in the active phase (18) treated with MMI. However, its mechanism of action still remains to be elucidated fully.

Recently, vitamin D receptor (VDR) agonists have exerted pleiotropic activities in immune regulation (19, 20). VDR agonists have been effective in several models of autoimmune disease (21). They are currently clinically exploited for the topical treatment of psoriasis, a Th1 cell-mediated autoimmune disease of the skin (22), but recent advances in understanding their immunomodulatory mechanisms suggest a wider applicability in the treatment of autoimmune diseases. In particular, the antiinflammatory properties of

First Published Online March 27, 2008

\* E.B. and E.S. contributed equally to this work.

Abbreviations: Ab, Antibody; AITD, autoimmune thyroid disease; GD, Graves' disease; I, Ionomycin; ID, identification; IFN, interferon; IFN $\gamma$ R, IFN $\gamma$  receptor; I $\kappa$ B, inhibitor  $\kappa$ B; mAb, monoclonal antibody; MMI, methimazole; NF, nuclear factor; P, Phorbol 12-myristate 13-acetate; pNF- $\kappa$ B, phospho Ser536 nuclear factor- $\kappa$ B; pStat1, phospho Tyr701 signal transducer and activator of transcription 1; Stat, signal transducer and activator of transcription; Tg, thyroglobulin; Th1, T-helper 1; Th2, T-helper 2; Th17, T-helper 17; VDR, vitamin D receptor.

*Endocrinology* is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

1

&lt;zjs;Thyroid - TRH - TSH&gt; • &lt;zjs;&gt;