

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Facoltà di Medicina e Chirurgia



DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE

XXI CICLO 2005-2008

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

Tesi di Dottorato

**Caratterizzazione dei recettori FPR, FPRL1 e FPRL2
nei basofili umani**

RELATORE

Ch.mo

Prof. Amato de Paulis

CANDIDATO

Dott.ssa

Bianca Liccardo

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA
SPERIMENTALE

XXI CICLO 2005-2008

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

Tesi di Dottorato

**Caratterizzazione dei recettori FPR, FPRL1 e FPRL2
nei basofili umani**

**RELATORE CANDIDATO Ch.mo Dott.ssa Prof. Amato de Paulis Bianca
Liccardo**

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Facoltà di Medicina e Chirurgia

INTRODUZIONE	3
MATERIALI E METODI	11
<i>Reagenti</i>	11
<i>Tamponi</i>	12
<i>Purificazione dei basofili dal sangue periferico</i>	12
<i>Culture cellulari</i>	13
<i>RT-PCR e PCR quantitativa</i>	14
<i>Chemiotassi</i>	14
<i>Dosaggio della lattico deidrogenasi</i>	16
<i>Analisi statistica</i>	16
RISULTATI	17
<i>FPR, FPRL1 e FPRL2 nei basofili umani</i>	17
<i>I basofili ed il virus dell'HIV-1</i>	17
<i>I basofili ed Helicobacter pylori</i>	19
<i>I basofili e l'urochinasi</i>	20
<i>I basofili e le proteine amiloidi</i>	22
DISCUSSIONE	24
BIBLIOGRAFIA	28
FIGURE	37

INTRODUZIONE.....	3
MATERIALI E METODI.....	11
Reagenti.....	11
Tamponi.....	12
<i>Purificazione dei basofili dal sangue periferico.....</i>	<i>12</i>
Colture cellulari.....	13
RT-PCR e PCR quantitativa.....	14
Chemiotassi.....	14
<i>Dosaggio della lattico deidrogenasi.....</i>	<i>16</i>
Analisi statistica.....	16
RISULTATI.....	17
FPR, FPRL1 e FPRL2 nei basofili umani.....	17
I basofili ed il virus dell'HIV-1.....	17
I basofili ed Helicobacter pylori.....	19
I basofili e l'urochinasi.....	20
ne amiloidi....I basofili e le protei.....	22
DISCUSSIONE.....	24
BIBLIOGRAFIA.....	28
FIGURE.....	37

INTRODUZIONE

Il reclutamento dei leucociti nei siti di infiammazione e di infezione è controllato da una varietà di proteine che includono le integrine, le molecole di adesione cellulare appartenenti alla famiglia delle immunoglobuline e numerose chemochine (1). Negli ultimi anni, sono state identificate diverse molecole chemiotattiche tra queste: *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), che rappresenta il primo composto strutturalmente definito, il *Platelet-Activating Factor* (PAF), le anafilotossine C5a e C3a, il leucotriene B₄ (LTB₄) e numerose chemochine (1,2). A differenza di altri agenti chemiotattici per i leucociti, fMLP può derivare da fonti endogene, come le proteine mitocondriali rilasciate in seguito alla lisi di svariati elementi cellulari, sia da fonti esogene, come le proteine appartenenti a patogeni (batteri Gram negativi) (3). Sia i classici agenti chemiotattici sia le chemochine attivano recettori a sette domini transmembrana accoppiati alle proteine G (GPCRs), espressi non solo sulle cellule di origine emopoietica, ma anche su altri tipi cellulari (4). Tali recettori partecipano ad essenziali processi fisio-patologici come l'infiammazione, l'emopoiesi, lo sviluppo, la guarigione delle ferite, l'infezione del virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1) e nella progressione delle neoplasie. Infatti, alcuni dei recettori GPCRs per chemochine promuovono l'angiogenesi, contribuendo in tal modo

INTRODUZIONE

Il reclutamento dei leucociti nei siti di infiammazione e di infezione è controllato da una varietà di proteine che includono le integrine, le molecole di adesione cellulare appartenenti alla famiglia delle immunoglobuline e numerose chemochine (1). Negli ultimi anni, sono state identificate diverse molecole chemiotattiche tra queste: N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), che rappresenta il primo composto strutturalmente definito, il Platelet-Activating Factor (PAF), le anafilotossine C5a e C3a, il leucotriene B

4

(LTB

4

) e numerose

chemochine (1,2). A differenza di altri agenti chemiotattici per i leucociti, fMLP può derivare da fonti endogene, come le proteine mitocondriali rilasciate in seguito alla lisi di svariati elementi cellulari, sia da fonti esogene, come le proteine appartenenti a patogeni (batteri Gram negativi) (3). Sia i classici agenti chemiotattici sia le chemochine attivano recettori a sette domini transmembrana accoppiati alle proteine G (GPCRs), espressi non solo sulle cellule di origine emopoietica, ma anche su altri tipi cellulari (4). Tali recettori partecipano ad essenziali processi fisio-patologici come l'infiammazione, l'emopoiesi, lo sviluppo, la guarigione delle ferite, l'infezione del virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1) e nella progressione delle neoplasie. Infatti, alcuni dei recettori GPCRs per chemochine promuovono l'angiogenesi, contribuendo in tal modo

3

alla neovascolarizzazione ed alla crescita tumorale (2,5). Inoltre, l'attivazione di tali recettori stimola la migrazione delle cellule tumorali con conseguente metastatizzazione (6,7).

I recettori per i peptidi formilati appartengono alla classe dei recettori metabotropici, accoppiati alle proteine G, e sono formati da una singola catena polipeptidica che attraversa sette volte la membrana plasmatica (1). Il recettore FPR è il recettore a più elevata affinità per fMLP: infatti, è attivato da concentrazioni picomolari di fMLP. Più recentemente, sono state identificate altre due proteine ad esso omologhe: FPR-like 1 (FPRL1, che viene attivato da elevate concentrazioni di fMLP) e FPR-like 2 (FPRL2) (8). L'espressione di FPR è stata descritta inizialmente nei neutrofili e nei monociti. In seguito la presenza di FPR è stata osservata anche su cellule dendritiche immature, piastrine, cellule della microglia, milza e midollo osseo (2,3,9,10). Inoltre, FPR è espresso sulla superficie di popolazioni cellulari non-ematopoietiche (epatociti, fibroblasti e neuroni) ed in alcuni tessuti (polmone, tiroide, cuore, stomaco e colon) (10). Studi recenti hanno dimostrato che FPR è selettivamente espresso dalle cellule derivate dal glioma altamente maligno umano, ma non da quello meno aggressivo o dagli astrociti umani normali (4). Tali dati rappresentano la prima evidenza che l'attivazione del recettore FPR facilita la progressione tumorale attraverso l'induzione della chemiotassi e della proliferazione cellulare, e promuove la produzione di VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) in risposta ad agonisti prodotti dalle cellule tumorali

alla neovascolarizzazione ed alla crescita tumorale (2,5). Inoltre, l'attivazione di tali recettori stimola la migrazione delle cellule tumorali con conseguente metastatizzazione (6,7).

I recettori per i peptidi formilati appartengono alla classe dei recettori metabotropici, accoppiati alle proteine G, e sono formati da una singola catena polipeptidica che attraversa sette volte la membrana plasmatica (1). Il recettore FPR è il recettore a più elevata affinità per fMLP: infatti, è attivato da concentrazioni picomolari di fMLP. Più recentemente, sono state identificate altre due proteine ad esso omologhe: FPR-like 1 (FPRL1, che viene attivato da elevate concentrazioni di fMLP) e FPR-like 2 (FPRL2) (8). L'espressione di FPR è stata descritta inizialmente nei neutrofili e nei monociti. In seguito la presenza di FPR è stata osservata anche su cellule dendritiche immature, piastrine, cellule della microglia, milza e midollo osseo (2,3,9,10). Inoltre, FPR è espresso sulla superficie di popolazioni cellulari non-ematopoietiche (epatociti, fibroblasti e neuroni) ed in alcuni tessuti (polmone, tiroide, cuore, stomaco e colon) (10). Studi recenti hanno dimostrato che FPR è selettivamente espresso dalle cellule derivate dal glioma altamente maligno umano, ma non da quello meno aggressivo o dagli astrociti umani normali (4). Tali dati rappresentano la prima evidenza che l'attivazione del recettore FPR facilita la progressione tumorale attraverso l'induzione della chemiotassi e della proliferazione cellulare, e promuove la produzione di VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) in risposta ad agonisti prodotti dalle cellule tumorali

necrotiche. L'attivazione di FPR nelle cellule del glioblastoma promuove la traslocazione nucleare della proteina HIF-1 α ed incrementa l'espressione di VEGF sia a livello di mRNA che di proteina (4).

L'espressione di FPRL1 (sia a livello di mRNA che di proteina) è stata dimostrata in diverse cellule: monociti, macrofagi, neutrofili, linfociti T e B, cellule della microglia, piastrine, cellule epiteliali, cellule endoteliali ed alcune cellule neoplastiche (astrocitoma e neuroblastoma). La presenza di FPRL2 è stata documentata in una ampia varietà di tessuti: milza, linfonodi, polmone, trachea, fegato e piccolo intestino (11). In relazione alla presenza dei recettori FPRs sui leucociti, è importante sottolineare che i neutrofili umani esprimono FPR e FPRL1, ma non FPRL2. I monociti umani invece, esprimono tutti e tre i recettori e mantengono tale espressione anche quando maturano in macrofagi (1). Viceversa, la differenziazione dei monociti in cellule dendritiche immature comporta una selettiva perdita dell'espressione di FPRL1, mentre la loro maturazione risulta nella perdita dell'espressione di FPR (12,13). FPRL2 è quindi l'unico recettore per fMLP espresso sia dalle cellule dendritiche immature che mature.

FPR, FPRL1 e FPRL2 sono funzionalmente accoppiati alla famiglia Gi delle proteine G (Gi1, Gi2, Gi3), come evidenziato dalla totale perdita della risposta cellulare ai rispettivi agonisti, dopo esposizione alla tossina della pertosse (2,3). L'interazione agonista/recettore attiva la proteina G eterotrimerica che si dissocia nelle subunità α e $\beta\gamma$, con conseguente attivazione

necrotiche. L'attivazione di FPR nelle cellule del glioblastoma promuove la traslocazione nucleare della proteina HIF-1 α ed incrementa l'espressione di VEGF sia a livello di mRNA che di proteina (4).

L'espressione di FPRL1 (sia a livello di mRNA che di proteina) è stata dimostrata in diverse cellule: monociti, macrofagi, neutrofili, linfociti T e B, cellule della microglia, piastrine, cellule epiteliali, cellule endoteliali ed alcune cellule neoplastiche (astrocitoma e neuroblastoma). La presenza di FPRL2 è stata documentata in una ampia varietà di tessuti: milza, linfonodi, polmone, trachea, fegato e piccolo intestino (11). In relazione alla presenza dei recettori FPRs sui leucociti, è importante sottolineare che i neutrofili umani esprimono FPR e FPRL1, ma non FPRL2. I monociti umani invece, esprimono tutti e tre i recettori e mantengono tale espressione anche quando maturano in macrofagi (1). Viceversa, la differenziazione dei monociti in cellule dendritiche immature comporta una selettiva perdita dell'espressione di FPRL1, mentre la loro maturazione risulta nella perdita dell'espressione di FPR (12,13). FPRL2 è quindi l'unico recettore per fMLP espresso sia dalle cellule dendritiche immature che mature.

FPR, FPRL1 e FPRL2 sono funzionalmente accoppiati alla famiglia Gi delle proteine G (Gi1, Gi2, Gi3), come evidenziato dalla totale perdita della risposta cellulare ai rispettivi agonisti, dopo esposizione alla tossina della pertosse (2,3). L'interazione agonista/recettore attiva la proteina G eterotrimerica che si dissocia nelle subunità α e $\beta\gamma$, con conseguente attivazione

della fosfolipasi C (PLC), del fosfoinositolo 3-chinasi (PI3K) e rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari. Quest'ultimo aspetto è una condizione necessaria per la chemiotassi dei neutrofili (14,15,16). Altri eventi intracellulari comprendono: l'attivazione di CD38, una glicoproteina di superficie che, agendo su NAD^+ , attiva una cascata di eventi che portano all'aumento delle concentrazioni di AMP ciclico (cAMP) ed il rilascio di Ca^{2+} a livello extracellulare; l'attivazione della PKC e quindi di Ras che attiva la cascata delle ERK1/2 MAP chinasi (*mitogen-activated protein kinases*).

La cascata delle MAP chinasi partecipano a diversi processi fisiologici che comprendono la crescita, la differenziazione e la migrazione cellulare, l'apoptosi e le risposte immunitarie. I tre principali gruppi di MAP chinasi nell'uomo sono rappresentati da ERK1/2 (*Extracellular Response Kinases*), JNKs (*Jun N-terminal kinases*) e p38 (1).

È noto che i recettori GPCRs vanno incontro a fenomeni di *desensibilizzazione*. La “desensibilizzazione omologa” è rapidamente indotta dal legame con l'agonista e si associa alla fosforilazione ed internalizzazione del recettore (17). Si può avere inoltre, una “desensibilizzazione eterologa” da parte dell'agonista che va ad influenzare dei recettori non correlati ad esso, attraverso vie dipendenti dall'attivazione della PKC. Sebbene i meccanismi responsabili dell'attivazione dei recettori GPCRs siano importanti per il funzionamento recettoriale, quelli coinvolti nell'inattivazione o nell'attenuazione dell'attività del recettore, in condizioni fisio-patologiche, sono ugualmente importanti nel

della fosfolipasi C (PLC), del fosfoinositolo 3-chinasi (PI3K) e rilascio di Ca^{2+} dai depositi intracellulari. Quest'ultimo aspetto è una condizione necessaria per la chemiotassi dei neutrofili (14,15,16). Altri eventi intracellulari comprendono: l'attivazione di CD38, una glicoproteina di superficie che, agendo su NAD^+ , attiva una cascata di eventi che portano all'aumento delle concentrazioni di AMP ciclico (cAMP) ed il rilascio di Ca^{2+} a livello extracellulare; l'attivazione della PKC e quindi di Ras che attiva la cascata delle ERK1/2 MAP chinasi (*mitogen-activated protein kinases*).

La cascata delle MAP chinasi partecipano a diversi processi fisiologici che comprendono la crescita, la differenziazione e la migrazione cellulare, l'apoptosi e le risposte immunitarie. I tre principali gruppi di MAP chinasi nell'uomo sono rappresentati da ERK1/2 (Extracellular Response Kinases), *JNKs* (*Jun N-terminal kinases*) e *p38* (1).

È noto che i recettori GPCRs vanno incontro a fenomeni di desensibilizzazione. La “desensibilizzazione omologa” è rapidamente indotta dal legame con l'agonista e si associa alla fosforilazione ed internalizzazione del recettore (17). Si può avere inoltre, una “desensibilizzazione eterologa” da parte dell'agonista che va ad influenzare dei recettori non correlati ad esso, attraverso vie dipendenti dall'attivazione della PKC. Sebbene i meccanismi responsabili dell'attivazione dei recettori GPCRs siano importanti per il funzionamento recettoriale, quelli coinvolti nell'inattivazione o nell'attenuazione dell'attività del recettore, in condizioni fisio-patologiche, sono ugualmente importanti nel

mantenimento di una risposta cellulare bilanciata. È stato dimostrato che l'inattivazione del recettore, denominata desensibilizzazione, dipende dalla sua fosforilazione, principalmente da parte di una famiglia di chinasi dei recettori accoppiati a proteine G (GRKs). Comunque, la sola fosforilazione recettoriale non è sufficiente a prevenire il legame e l'attivazione della proteina G. Invece, in caso di desensibilizzazione omologa, un membro della famiglia delle arrestine deve prima legare il recettore fosforilato. Questo legame previene l'associazione alla proteina G e determina uno stato di inattivazione del recettore. Dopo il legame con l'agonista, FPR tende a formare dei clusters e va incontro ad una rapida fosforilazione da parte di GRK2 e GRK3 sui residui di serina e treonina, localizzati nel dominio C-terminale. Questo processo è indipendente dall'attivazione della proteina G (2). Successivamente, FPR viene internalizzato negli endosomi (18). Anche FPRL1 viene fosforilato ed internalizzato dopo il legame con l'agonista attraverso una via clatrina e dinamina-dipendente (19). FPRL2 invece, viene fosforilato in assenza di ligando e presenta una duplice distribuzione nelle cellule, essendo localizzato in parte sulla membrana plasmatica ed in parte nei compartimenti intracellulari (19,20).

Un'interessante proprietà di FPR ed FPRL1 è la loro capacità di elicitare una desensibilizzazione eterologa di altri recettori, attraverso l'attivazione della PKC che fosforila residui di serina presenti nel tratto C-terminale, portando alla loro internalizzazione. In particolare, la desensibilizzazione eterologa è stata dimostrata per i recettori CXCR1 e CXCR2, attivati da IL-8 (1,2). Questi

mantenimento di una risposta cellulare bilanciata. È stato dimostrato che l'inattivazione del recettore, denominata desensibilizzazione, dipende dalla sua fosforilazione, principalmente da parte di una famiglia di chinasi dei recettori accoppiati a proteine G (GRKs). Comunque, la sola fosforilazione recettoriale non è sufficiente a prevenire il legame e l'attivazione della proteina G. Invece, in caso di desensibilizzazione omologa, un membro della famiglia delle arrestine deve prima legare il recettore fosforilato. Questo legame previene l'associazione alla proteina G e determina uno stato di inattivazione del recettore. Dopo il legame con l'agonista, FPR tende a formare dei clusters e va incontro ad una rapida fosforilazione da parte di GRK2 e GRK3 sui residui di serina e treonina, localizzati nel dominio C-terminale. Questo processo è indipendente dall'attivazione della proteina G (2). Successivamente, FPR viene internalizzato negli endosomi (18). Anche FPRL1 viene fosforilato ed internalizzato dopo il legame con l'agonista attraverso una via clatrina e dinamina-dipendente (19). FPRL2 invece, viene fosforilato in assenza di ligando e presenta una duplice distribuzione nelle cellule, essendo localizzato in parte sulla membrana plasmatica ed in parte nei compartimenti intracellulari (19,20).

Un'interessante proprietà di FPR ed FPRL1 è la loro capacità di elicitare una desensibilizzazione eterologa di altri recettori, attraverso l'attivazione della PKC che fosforila residui di serina presenti nel tratto C-terminale, portando alla loro internalizzazione. In particolare, la desensibilizzazione eterologa è stata dimostrata per i recettori CXCR1 e CXCR2, attivati da IL-8 (1,2). Questi

recettori sono desensibilizzati dopo il legame di fMLP con FPR. Analogamente, CCR5 e CXCR4, co-recettori del virus HIV-1, sono desensibilizzati in seguito all'attivazione di FPR ed FPRL1 da parte dei rispettivi ligandi (2).

L'interesse per il gruppo dei recettori FPRs scaturisce dalla loro capacità di prendere parte a differenti processi e soprattutto nel fatto che essi, oltre a legare fMLP, riconoscono una varietà di agonisti capaci di stimolare o inibire la risposta immune, in dipendenza della loro tipologia, concentrazione e del tipo di cellula coinvolto. Inoltre, poiché interagiscono con peptidi formilati di origine batterica, sono considerati importanti nella risposta dell'ospite ad infezioni microbiche.

Recentemente, sono state proposte ulteriori funzioni di questi recettori in quanto FPRL1 ed FPRL2 sono in grado di interagire con una molteplicità di ligandi associati a differenti malattie, incluse l'amiloidosi, l'Alzheimer, la malattia prionica (21) ed HIV-1 (2,22). FPRL1 ha una bassa affinità per il tripeptide formilato ed è considerato un recettore promiscuo, essendo in grado di riconoscere diversi peptidi sintetici (WKYMVm), peptidi naturali (la lipossina A₄, la proteina amiloide sierica, il frammento di 42 aminoacidi della proteina β -amiloide, il peptide prionico PrP₁₀₆₋₁₂₆, il sistema dell'urochinasi), peptidi di origine batterica [Hp(2-20) dell'*Helicobacter pylori*] e peptidi di derivazione virale (gp41 dell'HIV-1) (2,21,22). FPRL2, che non lega fMLP, è stimolato dall'urochinasi, da peptidi sintetici e da Hp(2-20) dell'*H. pylori* (Fig. 1) (23,24,25).

recettori sono desensibilizzati dopo il legame di fMLP con FPR. Analogamente, CCR5 e CXCR4, co-recettori del virus HIV-1, sono desensibilizzati in seguito all'attivazione di FPR ed FPRL1 da parte dei rispettivi ligandi (2).

L'interesse per il gruppo dei recettori FPRs scaturisce dalla loro capacità di prendere parte a differenti processi e soprattutto nel fatto che essi, oltre a legare fMLP, riconoscono una varietà di agonisti capaci di stimolare o inibire la risposta immune, in dipendenza della loro tipologia, concentrazione e del tipo di cellula coinvolto. Inoltre, poiché interagiscono con peptidi formilati di origine batterica, sono considerati importanti nella risposta dell'ospite ad infezioni microbiche.

Recentemente, sono state proposte ulteriori funzioni di questi recettori in quanto FPRL1 ed FPRL2 sono in grado di interagire con una molteplicità di ligandi associati a differenti malattie, incluse l'amiloidosi, l'Alzheimer, la malattia prionica (21) ed HIV-1 (2,22). FPRL1 ha una bassa affinità per il tripeptide formilato ed è considerato un recettore promiscuo, essendo in grado di riconoscere diversi peptidi sintetici (WKYMVm), peptidi naturali (la lipossina

A

4

, la proteina amiloide sierica, il frammento di 42 aminoacidi della proteina β -amiloide, il peptide prionico PrP

106-126

, il sistema dell'urochinasi), peptidi di origine batterica [Hp(2-20) dell'*Helicobacter pylori*] e peptidi di derivazione virale (gp41 dell'HIV-1) (2,21,22). FPRL2, che non lega fMLP, è stimolato dall'urochinasi, da peptidi sintetici e da Hp(2-20) dell'*H. pylori* (Fig. 1) (23,24,25).

L'osservazione che questi recettori possano essere attivati da molteplici stimoli consente di prospettare che essi siano implicati nei meccanismi di difesa nei confronti di patogeni e/o nella clearance di cellule danneggiate (2).

I basofili del sangue periferico esprimono recettori ad alta affinità per le IgE ($Fc\epsilon RI^+$) e svolgono un ruolo patogenetico fondamentale nelle malattie allergiche dell'apparato respiratorio e cutaneo (asma bronchiale, dermatite atopica, rinite allergica, ecc.) ed in molteplici condizioni patologiche dell'apparato cardiaco, gastrointestinale e muscolo-scheletrico (26,27).

Tali cellule sono capaci di sintetizzare e rilasciare istamina, che è in grado di contrarre la muscolatura liscia bronchiale, aumentare la permeabilità vascolare, modulare il flusso coronarico e la funzione linfocitaria. Inoltre, i basofili umani, dopo stimolazione IgE-mediata, sintetizzano leucotriene C_4 (LTC_4) (26,27) ed alcune citochine (IL-4, IL-13, e chemochine (MIP-1 α) (26).

È noto che i basofili intervengono nelle fasi ritardate della flogosi allergica dove sono reclutate per effetto di alcune specifiche chemochine: eotassina, RANTES, MCP-1. Diverse molecole di origine virale e batterica sono altresì in grado di esplicare un potente effetto chemiotattico sui basofili, contribuendo al loro reclutamento nei siti di flogosi tissutale (28).

Recenti evidenze sperimentali prodotte dal nostro gruppo indicano che i basofili esprimono tutti e tre i recettori (FPR, FPRL1, FPRL2) per fMLP. Questa osservazione consente di prospettare che tali cellule possano assumere diversi ruoli fisiopatologici (28).

L'osservazione che questi recettori possano essere attivati da molteplici stimoli consente di prospettare che essi siano implicati nei meccanismi di difesa nei confronti di patogeni e/o nella clearance di cellule danneggiate (2).

I basofili del sangue periferico esprimono recettori ad alta affinità per le IgE (FcεRI+) e svolgono un ruolo patogenetico fondamentale nelle malattie allergiche dell'apparato respiratorio e cutaneo (asma bronchiale, dermatite atopica, rinite allergica, ecc.) ed in molteplici condizioni patologiche dell'apparato cardiaco, gastrointestinale e muscolo-scheletrico (26,27).

Tali cellule sono capaci di sintetizzare e rilasciare istamina, che è in grado di contrarre la muscolatura liscia bronchiale, aumentare la permeabilità vascolare, modulare il flusso coronarico e la funzione linfocitaria. Inoltre, i basofili umani, dopo stimolazione IgE-mediata, sintetizzano leucotriene C

4

(LTC

4

) (26,27) ed alcune citochine (IL-4, IL-13, e chemochine (MIP-1α) (26).

È noto che i basofili intervengono nelle fasi ritardate della flogosi allergica dove sono reclutate per effetto di alcune specifiche chemochine: eotassina, RANTES, MCP-1. Diverse molecole di origine virale e batterica sono altresì in grado di esplicare un potente effetto chemiotattico sui basofili, contribuendo al loro reclutamento nei siti di flogosi tissutale (28).

Recenti evidenze sperimentali prodotte dal nostro gruppo indicano che i basofili esprimono tutti e tre i recettori (FPR, FPRL1, FPRL2) per fMLP. Questa osservazione consente di prospettare che tali cellule possano assumere diversi ruoli fisiopatologici (28).

9

È stato ampiamente provato che i basofili, normalmente presenti nella circolazione sanguigna, possono migrare nei siti di infiammazione allergica (29). È interessante sottolineare la loro presenza a livello tissutale anche in corso di infiammazione non allergica (28). Infatti, diverse osservazioni contribuiscono a rafforzare l'importanza crescente delle cellule $Fc\epsilon RI^+$ non soltanto nei meccanismi di flogosi dovuta ad allergeni, ma anche nella risposta immune evocata dai più disparati patogeni ed in alcuni processi patologici quali la crescita neoplastica.

In questo lavoro di tesi sono presentati i risultati di esperimenti volti a chiarire gli effetti di proteine sintetizzate da *Helicobacter pylori* (28), dal virus HIV-1 (30), della urochinasi (31) e di proteine amiloidogeniche (2), sui basofili umani attraverso l'attivazione dei recettori FPR, FPRL1 e FPRL2.

È stato ampiamente provato che i basofili, normalmente presenti nella circolazione sanguigna, possono migrare nei siti di infiammazione allergica (29). È interessante sottolineare la loro presenza a livello tissutale anche in corso di infiammazione non allergica (28). Infatti, diverse osservazioni contribuiscono a rafforzare l'importanza crescente delle cellule FcεRI+ non soltanto nei meccanismi di flogosi dovuta ad allergeni, ma anche nella risposta immune evocata dai più disparati patogeni ed in alcuni processi patologici quali la crescita neoplastica.

In questo lavoro di tesi sono presentati i risultati di esperimenti volti a chiarire gli effetti di proteine sintetizzate da *Helicobacter pylori* (28), dal virus HIV-1 (30), della urochinasi (31) e di proteine amiloidogeniche (2), sui basofili umani attraverso l'attivazione dei recettori FPR, FPRL1 e FPRL2.