

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE**

INDIRIZZO IN SCIENZE IMMUNO-REUMATOLOGICHE

XX Ciclo

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

Tesi di Dottorato

**ESPRESSIONE ED ATTIVITÀ FUNZIONALE
DELLO SCAMBIATORE $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX)
IN MACROFAGI E MONOCITI UMANI**

TUTOR

Chiar.mo

Prof. Massimo Triggiani

CANDIDATA

Dott. Rosaria Iaria Staiano

INDICE

| | |
|--|----------------|
| INTRODUZIONE | <i>pag. 1</i> |
| | |
| MATERIALI E METODI | |
| - Reagenti e buffers | <i>pag. 16</i> |
| - Isolamento e purificazione dei macrofagi polmonari umani | <i>pag. 17</i> |
| - Isolamento e purificazione dei monociti | <i>pag. 19</i> |
| - Analisi citofluorimetrica | <i>pag. 20</i> |
| - Colture cellulari | <i>pag. 21</i> |
| - Incubazioni cellulari | <i>pag. 21</i> |
| - RT-PCR per NCX1, NCX2, NCX3 | <i>pag. 22</i> |
| - Western Blot per NCX1, NCX2, NCX3 | <i>pag. 23</i> |
| - Variazioni delle concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} | <i>pag. 24</i> |
| - Dosaggio della β -glucuronidasi | <i>pag. 26</i> |
| - ELISA per il TNF- α | <i>pag. 26</i> |
| - Determinazione della vitalità cellulare | <i>pag. 27</i> |
| - Analisi statistiche | <i>pag. 28</i> |
| | |
| RISULTATI | |
| - Espressione di NCX1, NCX2 e NCX3 in HLM e monociti | <i>pag. 29</i> |
| - Effetto della soluzione Na^+ -free sulle concentrazioni citosoliche di Ca^{2+} in HLM e monociti | <i>pag. 33</i> |

| | |
|--|---------|
| - Effetto di un inibitore di NCX sull'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ indotta dalla soluzione Na^+ -free in HLM e monociti | pag. 35 |
| - Effetto dell'inibizione della Ca^{2+} -ATPasi del reticolo sarcoplasmatico sull'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ indotta dal Na^+ -free in HLM e monociti | pag. 37 |
| - Valutazione dell'effetto dell'inibitore CB-DMB sulla vitalità degli HLM | pag. 38 |
| - Effetto della soluzione Na^+ -free sull'esocitosi e la produzione di citochine in HLM e monociti | pag. 39 |
| DISCUSSIONE | pag. 42 |
| BIBLIOGRAFIA | pag. 49 |
| FIGURE | pag. 64 |

INTRODUZIONE

Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) è una proteina di membrana che opera da trasportatore ionico e partecipa al mantenimento dell'omeostasi cellulare dello ione calcio (Ca^{2+}) (Blaustein and Lederer, 1999). Il Ca^{2+} citosolico ha un ruolo importante in numerosi processi biochimici delle cellule eucariotiche, poiché rappresenta un messaggero intracellulare fondamentale (Blaustein and Lederer, 1999). Infatti, questo ione è un cofattore necessario per diversi enzimi cellulari che regolano funzioni quali l'espressione genica, la secrezione, la contrazione muscolare ed un gran numero di tappe metaboliche (Berridge, et al., 2000). Tutte le proteine che dipendono dal Ca^{2+} per la loro funzione sono molto sensibili alle sue concentrazioni citosoliche. Pertanto, variazioni anche minime delle concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) sono sufficienti a controllare la loro attività. Per tale motivo, qualsiasi condizione in grado di generare oscillazioni delle concentrazioni di Ca^{2+} determina un segnale intracellulare che partecipa ai meccanismi di trasduzione. In questo contesto, il Ca^{2+} può sia comportarsi da messaggero diretto sia influenzare l'attività di altri messaggeri intracellulari (Blaustein and Lederer, 1999). Le $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fisiologiche oscillano intorno a 100 nM e sono 20.000 volte inferiori rispetto a quelle presenti nei fluidi extracellulari (2 mM) (Tsien, 1988). In condizioni di equilibrio, la maggior parte del

calcio cellulare è legata a molecole presenti nel citosol (Blaustein, 1988, Carafoli, 1987) oppure è contenuto all'interno di organuli citoplasmatici (Meldolesi, et al., 1990, Pozzan, et al., 1994). In questi ultimi il calcio è in parte legato a proteine ed in parte è libero. Solo il calcio libero è potenzialmente scambiabile tra i vari compartimenti intracellulari e quindi capace di svolgere le funzioni di secondo messaggero. Le cellule eucariotiche possono incrementare il calcio libero citosolico in due modi: I) attraverso il rilascio del calcio immagazzinato nei depositi intracellulari (Laver, 2007) o II) evocando un influsso di calcio dal fluido extracellulare (Chakrabarti and Chakrabarti, 2006). I principali depositi intracellulari di calcio sono contenuti nei reticoli endoplasmatico (ER) e sarcoplasmatico (SR) (Laver, 2007). Il rilascio di Ca^{2+} dai depositi è a sua volta mediato da canali ionici controllati dai recettori dell'inositolo trifosfato (IP_3) (Mikoshiha, 2007) e dai recettori rianodinici (RYR) (Berridge, 1993, Clapham, 1995). L'influsso di calcio extracellulare, invece, è mediato dalla famiglia dei canali del calcio presenti sulla membrana citoplasmatica. Queste proteine formano pori selettivi che, quando attivati, consentono il passaggio di Ca^{2+} al loro interno e, in definitiva, causano una corrente di Ca^{2+} diretta verso l'interno della cellula. I canali del Ca^{2+} sono classificati a seconda del loro meccanismo di attivazione. Si conoscono: 1) canali ligando-dipendenti (o recettore-operati, ROCs), 2) canali controllati dagli stores intracellulari (SOCs) e

3) canali voltaggio-dipendenti (VOCs). Questi ultimi, a loro volta, si suddividono in canali di tipo L, N, T, e P, che si differenziano per la sensibilità al voltaggio e la distribuzione tessutale (Pearson, 2007). È importante sottolineare che, nonostante il calcio sia fondamentale per una serie di processi vitali, una prolungata persistenza di elevate concentrazioni all'interno della cellula può causare danno cellulare. Infatti, il Ca^{2+} non può essere metabolizzato come gli altri messaggeri molecolari, ed è per questo che le cellule sono dotate di numerose proteine specializzate nella sua estrusione che ne regolano finemente i livelli intracellulari. Infatti, la rimozione del calcio dal citoplasma è operata da pompe e scambiatori ionici, responsabili del ripristino di concentrazioni fisiologiche di questo ione all'interno del citosol. In particolare, ricordiamo la Ca^{2+} -ATPasi di membrana (PMCA) che estrude il calcio nel mezzo extracellulare, e la Ca^{2+} -ATPasi del reticolo sarco-endoplasmatico (SERCA) che internalizza il calcio nei depositi intracellulari. Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) si inserisce nell'insieme dei meccanismi regolatori finora descritti e con essi partecipa al controllo delle concentrazioni citosoliche del calcio. Tuttavia, a differenza delle proteine finora descritte, che mediano selettivamente l'esclusione del calcio citoplasmatico o il suo ingresso nella cellula, lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ presenta una caratteristica peculiare: può contribuire

indifferentemente all'insorgenza dei segnali Ca^{2+} -dipendenti ed alla rimozione del Ca^{2+} dal citosol.

La scoperta di uno scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ risale ai primi anni sessanta, quando due diversi gruppi di ricerca, a distanza di pochi anni, ipotizzarono la presenza di un meccanismo di controtrasporto che scambiava ioni Na^+ e Ca^{2+} attraverso la membrana cellulare (Baker and Blaustein, 1968, Baker, et al., 1969). In particolare, Luttgau e Niedergerke (Luttgau and Niedergerke, 1958) per primi dimostrarono che, nel muscolo cardiaco depolarizzato di rana, la rimozione del Na^+ esterno induceva la contrazione del tessuto. Quasi contemporaneamente, il gruppo di Niedergerke (Niedergerke, 1963) dimostrò che il ventricolo cardiaco di rana assorbiva Ca^{2+} quando esposto a soluzioni prive di Na^+ . Sulla base di queste osservazioni, fu ipotizzato che il Ca^{2+} entrasse nelle fibre muscolari attraverso un meccanismo di trasporto per il quale competevano Na^+ e Ca^{2+} , presumibilmente in rapporto $3\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$ (Niedergerke, 1963). Successivamente, mentre studiavano tessuti differenti, vari ricercatori giunsero contemporaneamente alla dimostrazione dell'esistenza di un meccanismo di controtrasporto ionico accoppiato, che implicava lo scambio contemporaneo di Na^+ e Ca^{2+} nei neuroni degli invertebrati (Baker and Blaustein, 1968, Blaustein and Hodgkin, 1969), nell'epitelio intestinale dei mammiferi (Martin and DeLuca, 1969) e nella muscolatura cardiaca dei mammiferi (Glitsch, et

al., 1970, Reuter and Seitz, 1968). Tuttavia, il progresso più importante nella conoscenza di NCX fu raggiunto nel 1988, quando il gruppo di Philipson purificò e clonò NCX1 (Nicoll, et al., 1990, Philipson, et al., 1988). Solo dieci anni più tardi, Nicoll propose il modello strutturale della proteina NCX, che è ancora il modello attualmente riconosciuto (Nicoll, et al., 1999, Qiu, et al., 2001) e che si riferisce alla proteina matura di NCX1 (**Fig. 1A**). Secondo questo modello, lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ è costituito da nove segmenti transmembranari (TMS) ripiegati ad α -elica, i quali costituiscono la regione idrofobica responsabile del trasporto ionico. Il dominio aminoterminale extracellulare si estende dal TMS1 al TMS5 ed è separato dal dominio carbossiterminale (TMS6-TMS9) da un ampio *loop* citoplasmatico, denominato *loop f*, che è sede di diverse regioni con funzioni regolatorie (Doering, et al., 1998). Entrambe le regioni amino- e carbossiterminale condividono un dominio di membrana che mostra due sequenze ripetute di circa 40 aminoacidi, designate come α -1 ed α -2 *repeats* (Iwamoto, et al., 2000, Qiu, et al., 2001). Queste sequenze, osservate in altri scambiatori correlati allo scambio di cationi (Philipson, et al., 2002, Schwarz and Benzer, 1997), sembrano essere fondamentali per la funzione di scambio ionico. Alcune evidenze indicano che la regione α -1 *repeat*, insieme alla sua parte non transmembranaria, e la regione α -2 *repeat*, insieme con la porzione carbossiterminale ad essa adiacente, si contrappongono durante il

ripiegamento della proteina, a formare due tasche ai lati opposti della membrana. Queste ultime costituiscono il sito responsabile della traslocazione ionica operata da NCX (Shigekawa and Iwamoto, 2001) (**Fig. 1B**). Il *loop f*, invece, pur non essendo coinvolto nel trasporto ionico, costituisce un importante sito di regolazione per l'attività di NCX. Questa regione contiene una serie di siti di legame per diverse molecole che possono modulare l'attività del trasportatore. Infatti, il *loop f* ospita: un dominio con attività inibitoria sullo scambiatore denominato regione XIP (Li, et al., 1991), una regione implicata nell'inattivazione Na^+ -dipendente di NCX, un sito ad alta affinità che lega il Ca^{2+} regolatorio non destinato al trasporto (Doering, et al., 1998, Ottolia, et al., 2001) e due siti che controllano lo splicing alternativo (Quednau, et al., 2004). È importante sottolineare che il legame del Ca^{2+} al sito regolatorio stimola l'attività di trasporto e rimuove l'inattivazione Na^+ -dipendente (Hilgemann, et al., 1992). Inoltre, il *loop f*, modula l'attività dello scambiatore interagendo con altri mediatori citoplasmatici, quali l'ossido nitrico (NO) (Asano, et al., 1995), il fosfatidilinositolo-4,5-difosfato (PIP_2) (Hilgemann and Ball, 1996, Hilgemann, et al., 1992), la fosfoarginina (PA) (DiPolo and Beauge, 1998, DiPolo, et al., 2004) e l'ATP (DiPolo, 1974). Quest'ultimo non è necessario per promuovere lo scambio ionico, dal momento che per il funzionamento di NCX non è richiesto alcun dispendio energetico. Tuttavia, l'ATP è in grado di

modulare la cinetica dello scambiatore attraverso la fosforilazione di siti presenti sulla sequenza del *loop f* (DiPolo, 1974, DiPolo and Beauge, 1987).

NCX opera secondo un meccanismo di controtrasporto transmembrana che prevede lo scambio di tre ioni Na^+ con uno ione Ca^{2+} secondo due possibili modalità: 1) la modalità *forward*, che prevede l'estrusione del Ca^{2+} e l'inclusione del Na^+ , 2) la modalità *inward* o *reverse*, che accoppia l'inclusione di ioni Ca^{2+} all'estrusione del Na^+ (**Fig. 2**). La modalità di trasporto dipende dalla forza elettrochimica trainante, ovvero dal gradiente di concentrazione del Na^+ e del Ca^{2+} e dal potenziale di membrana (Blaustein and Lederer, 1999, Iwamoto, 2004, Philipson and Nicoll, 2000). Tuttavia, il principale elemento di controllo sulla modalità di funzionamento dello scambiatore è rappresentato proprio dalla concentrazione di calcio intracellulare (DiPolo, 1979, Hilgemann, 1990). Infatti, in condizioni di equilibrio (cioè quando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ è circa 100 nM), solo una piccola frazione dello scambiatore è in funzione. Al contrario, NCX viene attivato quando il calcio intracellulare raggiunge concentrazioni micromolari, ovvero durante la fase di attivazione delle cellule eccitabili e secretorie. Un efflusso di Ca^{2+} può anche essere attivato dalla presenza di alte concentrazioni extracellulari di Na^+ e, viceversa, può essere inibito da alte concentrazioni intracellulari dello stesso ione (Blaustein and Santiago, 1977). D'altra

parte, un influsso di Ca^{2+} può essere causato dalla presenza di basse concentrazioni extracellulari di Na^+ (Fontana, et al., 1995) ed inibito da alte concentrazioni extracellulari di tale ione.

Attualmente si ritiene che lo scambiatore operi principalmente in modalità *forward* per consentire il ripristino delle normali concentrazioni dello ione in seguito ad un periodo di attività della cellula. Infatti, NCX contribuisce al mantenimento dell'omeostasi del calcio insieme ad altri meccanismi di *buffering* e di trasporto, come la PMCA (Carafoli, 1988) e la SERCA (Carafoli, 2002). A tale proposito, è importante sottolineare che la PMCA ha un'alta affinità per il Ca^{2+} , ma una bassa capacità di trasporto, ed inoltre necessita di ATP per il suo funzionamento. Al contrario NCX, pur avendo una bassa affinità per il Ca^{2+} , possiede una notevole capacità di trasporto, e soprattutto non consuma ATP per lo scambio ionico (Blaustein and Lederer, 1999). Queste prerogative rendono NCX particolarmente importante in caso di un prolungato sovraccarico di calcio ed in condizioni di stress cellulare, quando le riserve di ATP risultano compromesse. Per tali ragioni è facile comprendere perché nelle cellule eccitabili, dove il Ca^{2+} riveste un ruolo fondamentale nella modulazione dell'insorgenza del potenziale d'azione, NCX rappresenti uno dei maggiori meccanismi responsabili della regolazione dei livelli intracellulari di calcio (Carafoli, 1988). D'altra parte, è fondamentale considerare la possibilità che NCX possa lavorare

in modalità *reverse*, partecipando all'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ (Milanick and Frame, 1991). In tal modo, NCX può contribuire all'attivazione di tutti i meccanismi biochimici Ca^{2+} -dipendenti responsabili della trasduzione del segnale e della produzione di altri messaggeri intracellulari. Nei cardiomiociti, ad esempio, esso riveste un ruolo chiave nel processo di accoppiamento eccitazione-contrazione del muscolo cardiaco, contribuendo a sostenere le elevate concentrazioni di calcio necessarie a tali cellule per la fase di contrazione (Leblanc and Hume, 1990). Quale che sia la modalità di funzionamento, va ricordato che l'espressione di membrana di NCX pare sia concentrata nelle regioni subito adiacenti ai reticoli sarcoplasmatico (SR) ed endoplasmatico (ER) (Haddock, et al., 1999). Come accennato in precedenza, SR ed ER costituiscono i principali siti di deposito per il Ca^{2+} intracellulare, perciò la localizzazione dello scambiatore potrebbe significare che esso sia anche coinvolto nei processi di caricamento e svuotamento del Ca^{2+} dai reticoli. Dal momento che tali processi sono estremamente importanti per l'attività cellulare e per lo svolgimento dei processi fisiologici Ca^{2+} -dipendenti (Berridge, 1993), è verosimile che l'attività di NCX possa influenzare almeno alcune di queste importanti funzioni cellulari (Blaustein, 1993).

Attualmente, sono note tre isoforme di NCX, clonate in rapida successione: NCX1 (Nicoll, et al., 1990), NCX2 (Li, et al., 1994), e

NCX3 (Nicoll, et al., 1996). Nei mammiferi queste proteine sono codificate da geni situati su differenti cromosomi. Ciononostante, tutti i membri della famiglia NCX mostrano una elevata omologia della sequenza aminoacidica (Nicoll, et al., 1990) ed una struttura molecolare molto simile (Quednau, et al., 2004). NCX1 e NCX3 danno origine a molte varianti di splicing, le quali sono selettivamente espresse in differenti regioni e popolazioni cellulari del sistema nervoso centrale (SNC) (Quednau, et al., 1997, Yu and Colvin, 1997). Inoltre, sono state descritte forme tronche di NCX che, pur mancando di alcuni TMS, conservano l'attività di scambio ionico. Queste forme tronche potrebbero essere il risultato di uno *splicing* alternativo o di processi proteolitici, ma il loro significato attualmente non è noto (Iwata, et al., 1995, Li and Lytton, 1999, Saba, et al., 1999, Van Eylen, et al., 2001). Tutte le isoforme di NCX sono state descritte prevalentemente in tessuti eccitabili (Canitano, et al., 2002, Papa, et al., 2003), tra i quali cervello, cuore, muscolatura scheletrica, muscolatura liscia, rene, e retina, (Quednau, et al., 1997). Tuttavia, mentre i trascritti codificati dai geni NCX2 e NCX3 sono stati descritti esclusivamente nelle cellule neuronali e nelle fibrocellule muscolari scheletriche (Lee, et al., 1994), il gene NCX1 è espresso anche in cellule non eccitabili come le cellule epiteliali e stromali (Kita, et al., 2007). Nonostante NCX sia stato studiato utilizzando diversi modelli sperimentali sia *in vivo* che *in vitro* (Blaustein

and Lederer, 1999), l'espressione delle varie isoforme di NCX in cellule e tessuti umani è stata scarsamente caratterizzata. Tuttavia, è interessante notare che la presenza di NCX, o quantomeno di una attività di scambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, sono state ipotizzate anche in cellule del sistema immunitario. In particolare, già nel 1988 Simchowitzz ipotizzò la presenza di un meccanismo di scambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ nei neutrofili umani (Simchowitzz and Cragoe, 1988). Tale attività di scambio ionico aveva le caratteristiche cinetiche e stechiometriche tipiche del funzionamento di NCX, quindi influsso del Ca^{2+} stimolato da alte concentrazioni intracellulari e da basse concentrazioni extracellulari di Na^+ , con accoppiamento stechiometrico $3\text{Na}^+:1\text{Ca}^{2+}$. Analogamente, nei linfociti T umani fu ipotizzata la presenza di uno “scambiatore di Ca^{2+} sodio-dipendente” in grado di interferire con funzioni linfocitarie come la proliferazione in risposta a mitogeni e la produzione di interleuchina-2 (IL-2) (Wacholtz, et al., 1992). Successivamente, l'attività di scambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ nei linfociti è stata studiata nell'ambito della regolazione dell'omeostasi del Ca^{2+} (Balasubramanyam, et al., 1994) e recentemente è stato postulato che NCX possa essere necessario per la ripolarizzazione di membrana che segue un ciclo di attivazione cellulare (Tintinger and Anderson, 2004). Una implicazione importante di una eventuale presenza di NCX nelle cellule del sistema immunitario è che questo scambiatore possa essere implicato in funzioni cellulari rilevanti per le risposte immunitarie ed

infiammatorie. Ad esempio, è stato proposto che la modulazione del rilascio di istamina da parte dell'IL-3 nei basofili umani sia strettamente collegata alla concentrazione extracellulare di Na^+ (Beauvais, et al., 1994, Tedeschi, et al., 1995). Inoltre, in macrofagi peritoneali di topo è stato ipotizzato che NCX possa contribuire al ripristino di condizioni fisiologiche in seguito ad attivazione cellulare da parte del Platelet Activating Factor (Donnadieu and Trautmann, 1993, Randriamampita and Trautmann, 1990). Infine, è stato dimostrato che i mastociti di ratto presentano un'attività di trasporto ionico ascrivibile ad NCX, che sembra implicata nella secrezione di β -esosaminidasi (Rumpel, et al., 2000) e di istamina (Alfonso, et al., 1999, Lago, et al., 2001) dai granuli secretori. Queste cellule esprimerebbero selettivamente la forma NCX3, sebbene questa osservazione sia stata ottenuta valutando esclusivamente l'espressione a livello di mRNA (Aneiros, et al., 2005). In definitiva, i dati presenti ad oggi in letteratura non hanno ancora chiaramente dimostrato se nelle cellule immunocompetenti umane sia presente una o più isoforme funzionalmente attive di NCX. Tuttavia, essi suggeriscono che le cellule del sistema immunitario possano esprimere lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ al fine di modulare l'omeostasi ed il signaling dello ione Ca^{2+} . Infatti, la maggior parte delle cellule immunitarie dipende dal Ca^{2+} per numerose funzioni necessarie ai processi di attivazione cellulare. Pertanto, lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ potrebbe partecipare sia al ripristino

dei livelli fisiologici del Ca^{2+} dopo un ciclo di attivazione cellulare, sia all'incremento della sua concentrazione necessario per l'attivazione in risposta a stimoli di varia natura.

Nel sistema immunitario, le cellule del sistema dei fagociti mononucleati (Mononuclear Phagocyte System, MPS) rappresentano una popolazione cellulare distribuita ubiquitariamente. Queste cellule svolgono un ruolo fondamentale nell'immunità innata, nell'infiammazione, nel rimodellamento e nella riparazione dei tessuti (Gordon, 2007). Tutte le cellule del MPS derivano da un comune progenitore midollare CD34^+ che si differenzia nei monociti, che poi vengono rilasciati nel circolo sanguigno. Questi precursori circolanti, a loro volta, si differenziano in macrofagi o cellule dendritiche quando migrano nei vari organi e tessuti (Gordon and Taylor, 2005). Una delle caratteristiche principali del sistema MPS è la estrema eterogeneità dei suoi componenti. Già i precursori circolanti, i monociti, sono caratterizzati da un elevato grado di eterogeneità nell'espressione dei markers di superficie (Gordon and Taylor, 2005). Questo li rende capaci di rispondere ai numerosi stimoli presenti nel microambiente tessutale (citochine, prodotti batterici, etc.), che, in definitiva, determinano il fenotipo dei macrofagi maturi all'interno dei tessuti (Gordon, 2007). Pertanto, l'eterogeneità già esistente a livello dei monociti si amplifica nelle varie popolazioni di macrofagi che assumono caratteristiche

peculiari nei diversi tessuti. Infatti, a seconda della distribuzione tessutale, i macrofagi si distinguono in cellule di Langerhans nell'epidermide, osteoclasti nel tessuto osseo, macrofagi alveolari nel polmone, microglia nel SNC, cellule di Kupffer nel fegato e così via. Nei differenti distretti anatomici i macrofagi si specializzano in determinate funzioni, quali il rimodellamento osseo per gli osteoclasti (Quinn and Gillespie, 2005) e l'elevata espressione di recettori per la ricognizione dei patogeni (recettori del mannosio e recettori Toll-like) per i macrofagi polmonari (McCusker and Hoidal, 1989, Palecanda, et al., 1999, Taylor, et al., 2002). Questi ultimi, sono particolarmente coinvolti nell'eliminazione di microrganismi, virus e particolato di origine ambientale dal polmone. Nelle vie aeree, i macrofagi rappresentano le cellule immunitarie predominanti sia negli individui normali che nei pazienti con diverse patologie a carico dell'apparato respiratorio (Lohmann-Matthes, et al., 1994). Queste cellule svolgono un ruolo fondamentale in tutte le fasi della risposta immune e questo avviene soprattutto attraverso la produzione di numerosi mediatori (preformati o sintetizzati *de novo*) tra i quali enzimi lisosomiali, mediatori lipidici, citochine, chemochine e metalloproteinasi (Nathan, 1987). La produzione di queste molecole da parte dei macrofagi si verifica nella maggior parte dei casi in seguito all'attivazione di recettori di membrana di cui i macrofagi possiedono un vasto repertorio (Taylor,

et al., 2005). I macrofagi, infatti, sono cellule estremamente dinamiche, caratterizzate da un intenso riarrangiamento delle proteine di membrana e da continui processi di fusione e fissione associati ad endocitosi, fagocitosi e ricircolo delle membrane lisosomiali (Gordon, 2007). Questi fenomeni vengono ulteriormente intensificati durante i processi di attivazione cellulare che coinvolgono i meccanismi di trasduzione del segnale. Molti di questi fenomeni sono dipendenti da segnali intracellulari mediati dal Ca^{2+} (Hoyal, et al., 1998). Infatti, l'interazione di queste cellule con stimoli di varia natura, quali prodotti batterici, citochine, ed altri mediatori proinfiammatori, comporta il coinvolgimento di recettori e sistemi trasduzionali che determinano un rapido e consistente incremento del calcio intracellulare. Di conseguenza, molte funzioni delle cellule MPS si basano sulle variazioni delle concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} .

Le osservazioni finora descritte permettono di ipotizzare che macrofagi e monociti possano essere dotati di un sistema di regolazione del Ca^{2+} intracellulare come NCX. Pertanto, l'obiettivo di questo studio è stata la caratterizzazione dello scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ in macrofagi primari umani purificati da tessuto polmonare e in monociti isolati da sangue periferico.

MATERIALI E METODI

Reagenti e buffers

I seguenti materiali sono stati acquistati: la fosfolipasi secretoria di gruppo IA (sPLA₂, da *Naja mossambica mossambica*), Ficoll-Hypaque, Percoll, L-glutamina, soluzione di antibiotici ed antimicotici (10,000 UI/ml penicillina, 10 mg/ml streptomina e 25 µg/ml amfotericina B), LPS (da *Escherichia coli* sierotipo 026:B6), albumina sierica bovina (BSA), Triton X-100, fenolftaleina glucuronide, 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazano (MTT), dimetilsulfossido (DMSO), taspigargina e poly-L-lisina da Sigma (St. Louis, MO); RPMI 1640, DMEM, F12 ed FCS sono ICN; il Fura-2 acetossimetil estere (Fura-2AM) da Calbiochem; l'anticorpo monoclonale di topo contro NCX1 canino da Swant; gli anticorpi policlonali di coniglio contro NCX2 di ratto ed NCX3 di ratto da Alpha Diagnostic; l'anticorpo policlonale anti GAPDH (V-18) e l'anticorpo anti-topo coniugato a HRP da Santa Cruz; l'anticorpo anti-coniglio coniugato a HRP è Amersham; il derivato amiloridico 5-(N-4-clorobenzil)-20,40-dimetilbenzamide (CB-DMB) è stato sintetizzato come descritto precedentemente (Pignataro, et al., 2004). I vetrini sono stati acquistati da Fisher (Springfield, NJ); la linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y è stata acquistata dall'American Type Culture Collection; le cellule Baby hamster kidney

(BHK) wild-type o stabilmente trasfettate con il cDNA per l'isoforma NCX1 cardiaca canina, NCX2 e NCX3 di ratto sono state gentilmente donate dalla D.ssa Bettina Linck (University of California, Los Angeles, CA) (Linck, et al., 1998).

Il Pipes buffer è composto di 25 mM acido piperazin-N,N'-bis-2-etanosulfonico (Pipes, Sigma), 110 mM NaCl e 5 mM KCl, pH 7.4. Il Glycine buffer è composto di 400 mM di glicina e 400 mM di NaCl, pH 10.3. Il Lysis buffer (LB) per il Western blot è composto da Tris 20 mM pH 7.5, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 2 mM, leupeptina 10 µg/ml, NaF 10 mM, NaCl 150 mM, 1% Nonidet P-40 e 5% glicerolo. La soluzione salina di Krebs-Ringer è composta da NaCl 160 mM, KCl 5,5 mM, MgCl₂ 1,2 mM, CaCl₂ 1,5 mM, glucosio 10 mM, e Hepes-NaOH 10 mM, pH 7.4. La soluzione priva di Na⁺ (soluzione Na⁺-free) è così costituita: N-metil-D-glucamina 145 mM, KCl 5,5 mM, MgCl₂ 1,2 mM, CaCl₂ 1,5 mM, glucosio 10 mM, Hepes-NaOH 10 mM, pH 7.4. Il PBS buffer è composto da 136 mM NaCl, 373 mM KCl, 681 mM di KH₂PO₄, 123 mM Na₂HPO₄, pH 7,3. Tutti gli altri reagenti sono stati acquistati da Carlo Erba (Milano, Italia).

Isolamento e purificazione dei macrofagi polmonari umani

Il protocollo sperimentale che prevede l'uso di cellule del sangue e del tessuto polmonare umani è stato approvato dal Comitato Etico

dell'Università di Napoli Federico II ed è stato ottenuto il consenso informato dai donatori di sangue e dai pazienti sottoposti ad intervento di chirurgia toracica.

I macrofagi polmonari umani (HLM) sono stati isolati a partire dal parenchima polmonare di pazienti sottoposti a chirurgia toracica (Triggiani, et al., 2000). Il tessuto macroscopicamente sano è stato tagliato accuratamente in frammenti e sottoposto a ripetuti lavaggi con PIPES su strato di Nytex (con pori di 120 μm di diametro). La sospensione cellulare ottenuta, contenente tra il 75% e 85% di macrofagi, è stata sottoposta a gradiente discontinuo di Percoll e le cellule sono state quindi risospese (10^6 cellule/ml) in RPMI contenente 5% di siero bovino fetale (FCS), 2 mM di L-glutamina e 1% di soluzione antibiotica-antimicotica. Le cellule sono state infine incubate in piastre di polistirene, in incubatore a 37°C con un'atmosfera contenente il 5% di CO₂. Dopo 12 ore il mezzo di coltura è stato rimosso e le cellule flottanti sono state allontanate mediante lavaggio con RPMI. Con questa procedura più del 98% delle cellule aderenti è rappresentato da macrofagi, come dimostrato dalla positività al test dell' α naftil-acetato esterasi (Triggiani, et al., 2000). In esperimenti in cui sono stati utilizzati HLM appena purificati e non sottoposti ad aderenza, le cellule sono state centrifugate ripetutamente su gradienti di Percoll fino ad ottenere una

purezza >95% come dimostrato dalla positività per CD/CD71/HLA DR valutata mediante citofluorimetria.

Isolamento e purificazione dei monociti

I monociti sono stati isolati da buffy coat di donatori sani ottenuti dall'Unità Immunotrasfusionale dell'Ospedale Cardarelli di Napoli. Le cellule mononucleate del sangue periferico (PMBC) sono state isolate mediante centrifugazione su gradiente di Ficoll (densità 1077). I monociti (Mono) sono stati ulteriormente purificati mediante selezione immunomagnetica negativa (Miltenyi Biotec GmbH, Bergish-Gladbach, Germania) come precedentemente descritto (Triggiani, et al., 2002). I PBMC sono stati prima incubati (15 min, 37°C) con un cocktail di anticorpi monoclonali coniugati con biotina anti-CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 e glicoforina A e successivamente con microbiglie MACS accoppiate con un anticorpo monoclonale anti-biotina. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate e fatte passare attraverso un campo magnetico. Questa procedura permette di ottenere una popolazione di monociti con un purezza di 90-95% come dimostrato dall'analisi citofluorimetrica del CD14.

Analisi citofluorimetrica

L'espressione dei marcatori di superficie è stata analizzata con l'immunofluorescenza diretta ed il citofluorimetro (FACSCalibur, Becton Dickinson), secondo il protocollo riportato di seguito. L'analisi è stata eseguita sui monociti e sui macrofagi polmonari immediatamente dopo l'isolamento. Le cellule sono state risospese in PBS alla concentrazione di circa 5×10^6 /ml. 5 μ l di sospensione cellulare sono stati incubati (4°C, 20 minuti) con gli anticorpi specifici. Per ridurre l'autofluorescenza spontanea dei macrofagi, le cellule sono state lavate due volte con PBS, risospese in 0,2 ml con una soluzione di Crystal Violet (Certistain[®], Merck, Darmstad, Germania) ed incubate per 5 minuti a 22°C (Umino, et al., 1999). Per l'acquisizione e l'analisi è stato usato il Cell-Quest software (Becton Dickinson). I valori sono espressi come percentuale di cellule positive e negative. Il punto di cut-off tra cellule positive e negative viene stabilito con il controllo isotipico. Le cellule sono considerate positive quando la loro fluorescenza è maggiore di quella osservata nelle cellule marcate con il controllo negativo. L'intensità della fluorescenza viene analizzata calcolando la media dell'intensità di fluorescenza espressa in unità lineari.

Colture Cellulari

Le cellule BHK wild-type (BHK-WT) sono state mantenute in coltura (37°C, 5% CO₂) su piastre di polietilene in un mezzo costituito da DMEM/F12 (1:1 vol/vol) contenente il 5% di FCS, l'1% di L-glutamina e l'1% di soluzione antibiotica. Le cellule BHK stabilmente transfettate con cDNA per le isoforme NCX1 (BHK-NCX1), NCX2 (BHK-NCX2) e NCX3 (BHK-NCX3) sono state mantenute nello stesso mezzo di coltura arricchito con il 4% di metotrexato (Linck, et al., 1998). Le cellule SH-SY5Y sono state mantenute in coltura (37°C, 5% CO₂) in piastre di polietilene in un mezzo costituito da RPMI-1640 contenente il 10% di FCS, l'1% di L-glutamina e l'1% di soluzione antibiotica.

Incubazioni Cellulari

I macrofagi aderenti sono stati incubati (37°C, 4 h) con la soluzione salina Krebs-Ringer, con la soluzione Na⁺-free o con sPLA₂ (1 µg/ml). In alcuni esperimenti, le cellule sono state preincubate per 60 min a 37°C in soluzione Krebs-Ringer con il derivato amiloridico CB-DMB (10 µM), prima dell'aggiunta di Na⁺-free o sPLA₂. Al termine del periodo di incubazione, il soprannatante è stato raccolto, centrifugato due volte (1.000 g, 4°C, 5 min) e conservato a -80°C per la successiva determinazione del rilascio di β-glucuronidasi e TNF-α. Le cellule rimanenti nei pozzetti sono state lisate con Triton X-100 0,1 % per la

determinazione del contenuto cellulare totale di proteine e β -glucuronidasi.

RT-PCR per NCX1, NCX2 e NCX3

L'RNA cellulare totale è stato estratto da HLM, monociti e SH-SY5Y mediante l'uso del sistema di isolamento SV 96 total RNA (Promega) e trattato con RNase-free DNase I. 1 μ g di RNA totale è stato retroscritto con 25 mM MgCl₂, 50 μ M oligo(dT) e 200 U di Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). I cDNA ottenuti da HLM, monociti e SH-SY5Y sono stati normalizzati per GAPDH e l'espressione di NCX1, NCX2 e NCX3 è stata analizzata mediante PCR semiquantitativa utilizzando primers specifici per NCX1, NCX2, NCX3 e GAPDH, disegnati sulla base delle sequenze pubblicate (GenBank accession No. AC007254, NCX1; NM_015063, NCX2; AF508982, NCX3) mediante il software Beacon Designer 3.0 (Biorad) e sintetizzati da Invitrogen (NCX1 forward: 5'-GGT GGT GGT CGT CGT TAG TC-3', reverse: 5'-GGC ATG GTC TCG GCT CAC-3'; NCX2 forward: 5'-AGA GGA CCA ATG CTA CAA G-3', reverse: 5'-CTA CCG ACA GAT GGA AGG-3'; NCX3 forward: 5'-GGC AGT GAT GAG ATG AGA G-3', reverse: 5'-CCG ATT ATA CAT TGA GCG ATA G-3'). Templati equivalenti di cDNA ottenuti da HLM, monociti e SH-SY5Y sono stati amplificati in accordo con il seguente protocollo: dopo un fase

iniziale di denaturazione a 95 C° per 10 minuti, è stata effettuata l'amplificazione con 35 cicli di denaturazione (94C°) per 20 secondi e l'annealing (55C°) per 30 secondi. I prodotti della PCR sono stati separati su gel di agarosio 1,5%, marcati con etidio bromuro e visualizzati attraverso il sistema di analisi ChemidocXRS (Biorad).

Western blot per NCX1, NCX2 e NCX3

HLM, monociti e cellule BHK sono stati lisati in lysis buffer (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 2 mM, leupeptina 10 µg/ml, NaF 10 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1% e glicerolo 5%, pH 7.5). I lisati cellulari sono stati incubati in ghiaccio per 20 minuti e poi centrifugati (14.000 rpm, 4C°, 20 min). Un'aliquota degli estratti proteici ottenuti è stata prelevata per la determinazione del contenuto proteico mediante BCA Protein Assay Kit (Novagen). I rimanenti estratti proteici sono stati diluiti in litio dodecil-solfato (LDS) sample buffer con (condizioni riducenti, r+) o senza (condizioni non riducenti, r-) 2β-mercaptoetanololo al 2,5% ed esposti a 100 C° per 5 min (condizioni denaturanti, d+) o no (condizioni non denaturanti, d-) prima di essere conservati a -80C°. Estratti proteici equivalenti (30-60 µg di proteine per campione) sono stati separati su gel Bis-Tris al 4-12% Bis-Tris (NuPAGE®, Novex) e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa (Schleicher & Schuell) insieme ad un marcatore di pesi molecolari

biotinilato. Dopo l'immersione overnight in TBST (Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM e Tween 20 0,05%) contenete 5% di caseina, le membrane sono state lavate tre volte (la durata di ogni lavaggio è 10 min) con TBST e poi incubate (4°C, overnight) con un anticorpo monoclonale di topo anti-NCX1 (diluito 1:500), un anticorpo policlonale di coniglio anti-NCX2 (1:250), o un anticorpo policlonale di coniglio anti-NCX3 (1:250). Dopo il lavaggio, le membrane sono state incubate (22°C, 1 h) con un anticorpo di capra anti IgG di topo coniugato con perossidasi o un anticorpo di scimmia anti IgG di coniglio insieme a un anticorpo anti-biotina coniugato con perossidasi. Gli anticorpi legati alle membrane sono stati visualizzati con un sistema di chemiluminescenza per western blot (ECL Plus, Amersham Biosciences) e sviluppati grazie al sistema di acquisizioni di immagini ChemiDoc XRS.

Variazioni delle concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$)

La concentrazione intracellulare di calcio ($[Ca^{2+}]_i$) e le sue variazioni sono state misurate in tempo reale su singole cellule grazie ad un sistema di videoimaging computerizzato, secondo una tecnica già riportata (Secondo, et al., 2000). Monociti, MDM e macrofagi polmonari, piastrati su vetrini polilisinati, sono stati incubati con Fura-2 acetossimetilestere (Fura-2AM) 3 μ M per 1 ora a temperatura ambiente in soluzione Krebs-Ringer, pH 7,4. Alla fine del periodo di incubazione

con il Fura-2AM, i vetrini sono stati sistemati in una camera di perfusione (Medical System, Co. Greenvale, NY, USA) montata su un microscopio a fluorescenza invertito Nikon Diaphot (Nikon, Torrance, CA, USA). Le cellule sono state stimulate con soluzione Na^+ -free grazie ad una iniezione veloce della soluzione nella camera del microscopio. In esperimenti selezionati, le cellule sono state preincubate con tapsigargina ($1 \mu\text{M}$, 37°C , 10 min) o il derivato amiloridico CB-DMB ($10 \mu\text{M}$, 37°C , 5-60 min) prima della stimolazione con la soluzione Na^+ -free. Una lampada da 100 Watt Xenon (Osram, Berlin, Germany) con una ruota girafiltri controllata dal computer, che supporta due differenti filtri (340 e 380 nm), illumina il campo del microscopio con una luce UV ogni 3 s, alternando i due filtri con un intervallo di 500 ms. L'intervallo tra le due illuminazioni è di 2 secondi mentre quello tra i movimenti dei filtri è di un secondo. In tal modo, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ viene misurata ogni 3 secondi. La luce emessa attraversa uno specchio dicroico a 400 nm, è filtrata a 510 nm e raccolta da una camera CCd (Photonic Science, Robertsbridge, East Sussex, UK) connessa ad una luce amplificata. Le immagini sono state acquisite ed analizzate con un processore Magiscan Image (Applied Imaging Ltd, Dukesway, UK) supportato da un software, AUTOLAB (RBR Altair, Firenze, Italia). I valori ratiometrici sono stati automaticamente convertiti dal software nelle $[\text{Ca}^{2+}]_i$ usando una curva di calibrazione ottenuta in esperimenti preliminari (Grynkiewicz, et al.,

1985). Per ogni condizione sperimentale, sono state analizzate tra 30 e 45 cellule.

Dosaggio della β -Glucuronidasi

Il rilascio di β -glucuronidasi nei sopranatanti o nei lisati cellulari è stato quantificato con un saggio colorimetrico (Triggiani, et al., 2000). In sintesi, 100 μ l di sopranatante o lisato cellulare sono stati incubati (37°C, 18 h) con 200 μ l di acetato buffer 0,1 M, a pH 4,5, contenente 1 μ mol di fenoltaleina glucuronide. Alla fine dell'incubazione, 1 ml di glycine buffer è stato aggiunto ad ogni tubo e 200 μ l della miscela sono stati trasferiti in pozzetti di una piastra da 96 pozzetti e letti allo spettrofotometro ad una lunghezza di 540 nm. Il rilascio di β -glucuronidasi è stato calcolato come percentuale rispetto al contenuto cellulare, determinato in cellule lisate con lo 0,1% di Triton X-100. Tutte le determinazioni sono state effettuate in duplicato.

ELISA per il TNF- α

Il rilascio di TNF- α nei sopranatanti dei macrofagi è stato misurato mediante un kit ELISA acquistato da Euro Clone, in accordo con le istruzioni fornite dal produttore. L'intervallo di linearità è compreso tra 20 e 800 pg/ml. Dal momento che il numero di macrofagi aderenti può variare tra i diversi pozzetti di una piastra e tra i differenti esperimenti, i

risultati sono stati normalizzati per il contenuto totale di proteine di ogni pozzetto, determinato nei lisati cellulari (0.1% Triton X-100) con un dosaggio delle proteine secondo il metodo Bradford (Biorad).

Determinazione della vitalità cellulare

Al termine degli esperimenti con il CB-DMB la vitalità cellulare è stata determinata attraverso il saggio dell'3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltriazolo bromuro (MTT). Il mezzo di coltura è stato rimosso e le cellule sono state incubate in 500 µl di una soluzione di PBS contenente MTT alla concentrazione di 0,5 mg/ml (1 ora, 37°C, 5% CO₂). Le deidrogenasi mitocondriali riducono l'MTT convertendolo in formazano, composto non solubile in acqua e otticamente attivo alla lunghezza d'onda di 540 nm (Amoroso, et al., 1999, Hansen, et al., 1985). Al termine dell'incubazione la soluzione è stata sostituita da 1 ml di dimetilsolfossido (DMSO) per solubilizzare i sali di formazano formati. Infine, 200 µl della miscela sono stati trasferiti in pozzetti di una piastra da 96 pozzetti e letti allo spettrofotometro. I risultati sono stati espressi in percentuale rispetto ai valori ottenuti da cellule non trattate.

Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm ES del numero indicato di esperimenti. Il valore di p è stato determinato con il test t di Student per campioni accoppiati (Snedecor, 1980).

RISULTATI

Espressione di NCX1, NCX2 e NCX3 in HLM e monociti

Nella prima serie di esperimenti è stata valutata l'espressione dell'mRNA per le tre isoforme di NCX mediante RT-PCR. In questi esperimenti sono state esaminate quattro differenti preparazioni di HLM e monociti (Mono) mediante l'uso di primers specifici disegnati *ad hoc* per NCX1, NCX2 e NCX3. La **Figura 3** mostra i prodotti di amplificazione di NCX1 (prima riga), NCX2 (seconda riga), NCX3 (terza riga) e del gene costitutivo GAPDH (ultima riga), ottenuti in due preparazioni di HLM e monociti. L'espressione genica delle popolazioni cellulari in esame è stata confrontata con quella di una linea di neuroblastoma umano, SH-SY5Y, utilizzata come controllo positivo dato che esprime costitutivamente la tre isoforme di NCX (Magi, et al., 2005). Sia HLM che monociti esprimono cDNA delle dimensioni attese per NCX1 (100 bp.) ed NCX3 (139 bp.) e con caratteristiche del tutto analoghe ai cDNA delle SH-SY5Y. Nessuno dei due tipi cellulari presenta mRNA per NCX2 che, come previsto, è presente nelle cellule SH-SY5Y. Questi risultati indicano che i macrofagi ed i monociti umani esprimono mRNA per NCX1 e NCX3, ma non per NCX2. L'analisi densitometrica di quattro esperimenti ha mostrato che i rapporti NCX1/GAPDH e NCX3/GAPDH sono significativamente più elevati (p

< 0,05) nei macrofagi (NCX1/GAPDH: $0,59 \pm 0,07$; NCX3/GAPDH: $0,51 \pm 0,08$) rispetto a i monociti (NCX1/GAPDH: $0,42 \pm 0,04$; NCX3/GAPDH: $0,35 \pm 0,02$). Questi dati suggeriscono che l'espressione di NCX1 ed NCX3 è maggiore nei macrofagi rispetto ai monociti.

Successivamente, abbiamo verificato che i macrofagi ed i monociti, oltre all'mRNA, sintetizzassero anche le proteine corrispondenti per le due isoforme di NCX. A tale scopo, sono stati effettuati esperimenti di western blot sugli estratti proteici ottenuti da tali popolazioni cellulari. Va segnalato che l'analisi in western blot delle isoforme di NCX di origine umana è resa difficile dalla mancanza di anticorpi specifici. Inoltre, la mobilità elettroforetica delle proteine NCX varia quando gli estratti proteici delle cellule sono esposti a condizioni riducenti e/o denaturanti (Iwata, et al., 1995, Wang, et al., 1996). Per questo motivo, abbiamo condotto esperimenti preliminari al fine di ottimizzare le condizioni sperimentali per valutare la presenza di NCX1 e NCX3 in macrofagi e monociti umani. In questi esperimenti, sono stati utilizzati due anticorpi diretti contro NCX1 di cane ed NCX3 di ratto, che sono gli unici anticorpi attualmente disponibili in commercio. Come controlli positivi sono state utilizzate cellule BHK stabilmente transfettate con la forma NCX1 di cane o con la forma NCX3 di ratto (Linck, et al., 1998), mentre le corrispondenti cellule *wild type* sono state utilizzate come controlli negativi (Linck, et al., 1998). La preparazione dei lisati proteici

e l'allestimento del western blot sono stati effettuati in modo da confrontare simultaneamente gli estratti proteici esposti a diverse condizioni di riduzione e/o denaturazione. La **Figura 4** mostra che l'anticorpo anti-NCX1 è in grado di riconoscere la proteina NCX1 transfettata nelle BHK-NCX1, mentre non rileva nessuna banda nelle cellule *wild type*. Inoltre, le condizioni ottimali per il rilevamento di NCX1 si verificano quando gli estratti proteici cellulari vengono esposti a condizioni riducenti e soprattutto non denaturanti. La denaturazione, infatti, sembra eliminare in maniera pressoché completa l'immunoreattività dell'anticorpo verso NCX1. Risultati del tutto analoghi sono stati ottenuti analizzando le BHK transfettate con NCX3 (dati non mostrati). Sulla base dei risultati ottenuti, abbiamo analizzato la presenza di NCX1 e NCX3 in lisati cellulari di HLM e monociti preparati in condizioni riducenti e non denaturanti. La **Figura 5A** mostra che l'anticorpo anti-NCX1 riconosce una banda immunoreattiva principale di circa 110 kDa in tutte le preparazioni di HLM e monociti. Tale banda ha caratteristiche elettroforetiche sovrapponibili a quelle della proteina *full-length* NCX1 transfettata nelle BHK. Una banda minore di circa 90 kDa è presente in tutti i tipi cellulari esaminati, tuttavia non è possibile stabilire se essa rappresenti un frammento proteolitico, un prodotto di splicing alternativo (Iwata, et al., 1995, Li and Lytton, 1999, Saba, et al., 1999, Van Eylen, et al., 2001) o una proteina cross-reattiva. Altre due bande

immunoreattive di circa 70 e 60 kDa vengono evidenziate nei macrofagi, ma non nei monociti. Tali bande potrebbero essere, rispettivamente, la forma tronca di NCX1, descritta in altri tipi cellulari, e uno dei suoi frammenti proteolitici (Li and Lytton, 1999, Van Eylen, et al., 2001). Invece, i monociti mostrano selettivamente un'ampia area immunoreattiva di alto peso molecolare (compreso tra 140 e 200 kDa), presente anche nelle cellule BHK-NCX1, e che potrebbe rappresentare la forma di circa 160 kDa descritta in alcuni tipi cellulari e derivante da processi di glicosilazione o ossidazione (Van Eylen, et al., 2001).

Quando le stesse preparazioni di HLM e monociti sono state esaminate con l'anticorpo anti-NCX3 (**Fig. 5B**), hanno mostrato una banda immunoreattiva più evidente di circa 100 kDa che migra insieme alla proteina NCX3 transfettata nelle BHK-NCX3 e che non viene evidenziata nelle cellule BHK-wild type. Altre bande immunoreattive di circa 80 e 70 kDa sono state riscontrate in macrofagi, monociti e cellule BHK-NCX3. Anche per queste bande non ci sono informazioni sufficienti per stabilire se esse rappresentino frammenti proteolitici, prodotti di splicing alternativo o proteine crossreattive. Tuttavia, è importante sottolineare che tutte le bande immunoreattive evidenziate dagli anticorpi anti-NCX1 ed anti-NCX-3 non sono state riconosciute da IgG irrilevanti di topo e coniglio utilizzati, rispettivamente, come controlli isotipici (dati non mostrati). Questi risultati indicano che i macrofagi umani ed i monociti

esprimono entrambe le proteine NCX1 e NCX3. È interessante notare che, così come per l'espressione dell'mRNA, l'analisi densitometrica di NCX1 ed NCX3 nativi, effettuata su tre esperimenti, ha mostrato che i livelli di entrambe le proteine sono significativamente ($p < 0,01$) più elevati nei macrofagi (NCX1: 449 ± 40 Intensità/ μg di proteine; NCX3: 386 ± 18) rispetto a i monociti (NCX1: 211 ± 31 ; NCX3: 179 ± 29). Questi dati suggeriscono che l'espressione di NCX1 ed NCX3 è maggiore nei macrofagi rispetto ai monociti. Nell'insieme, i risultati ottenuti dall'analisi dell'espressione genica e dell'espressione proteica dimostrano per la prima volta la presenza di NCX1 ed NCX3, ma non di NCX2, in macrofagi e monociti umani.

Effetto della soluzione Na^+ -free sulle concentrazioni citosoliche di Ca^{2+} in HLM e monociti

NCX può effettuare lo scambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ in maniera bidirezionale a seconda del gradiente ionico transmembranario. In particolare, NCX può operare in modalità *forward* (influsso di Na^+ accoppiato ad efflusso di Ca^{2+}) e modalità *reverse* (efflusso di Na^+ / influsso di Ca^{2+}) (Blaustein and Lederer, 1999, Wakabayashi and Goshima, 1981). Sfruttando questa prerogativa dello scambiatore, è stato messo a punto un modello sperimentale per analizzare l'attività di NCX in modalità *reverse* mediante attivazione con una soluzione fisiologica mancante dello ione

Na⁺ (soluzione Na⁺-free). Tale ione viene sostituito da N-metilglucammina allo scopo di lasciare invariata l'osmolarità della soluzione. La perfusione di cellule che esprimono NCX con questa soluzione *Na⁺-free* produce un incremento dei livelli basali intracellulari dello ione Ca²⁺, che può essere valutato con una tecnica di microfluorimetria su singola cellula. Questa tecnica è stata utilizzata per studiare l'attività funzionale di NCX in macrofagi (HLM) e monociti (Mono) umani. La **Figura 6** mostra che l'esposizione alla soluzione Na⁺-free di HLM (pannello A) e Mono (pannello B) induce un rapido e lineare incremento della [Ca²⁺]_i. Il segnale del Ca²⁺ nei due tipi cellulari è comparabile in termini di ampiezza e durata, e la percentuale di cellule responsive è molto vicina al 95% in tutti gli esperimenti. La **Figura 7** mostra la quantificazione dell'influsso di Ca²⁺ indotto dalla soluzione Na⁺-free, calcolata monitorando da 30 a 45 cellule durante i singoli esperimenti HLM e Mono. Il grafico a barre mostra che l'esposizione alla soluzione Na⁺-free induce un incremento significativo (circa 100 nmoli) della [Ca²⁺]_i sia in HLM che monociti in tre differenti esperimenti. Questi risultati indicano che l'esposizione di HLM e monociti al Na⁺-free induce un influsso di Ca²⁺ che, verosimilmente, è da attribuire all'attività di NCX.

Effetto di un inibitore di NCX sull'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ indotta dalla soluzione Na^+ -free in HLM e monociti

Allo scopo di verificare che l'influsso di Ca^{2+} determinato dall'esposizione di HLM e monociti alla soluzione Na^+ -free fosse realmente dovuto ad NCX, nella successiva serie di esperimenti, le cellule sono state preincubate (1 ora, $37^\circ C$) con un inibitore di NCX (CB-DMB, $10 \mu M$) (Andreeva, et al., 1991) prima dell'esposizione alla soluzione Na^+ -free. Il CB-DMB è una molecola sintetizzata (Rogister, et al., 2001), insieme ad altri composti strutturalmente correlati, a partire dall'amiloride (Annunziato, et al., 2004). La **Figura 8A** mostra la sovrapposizione dei tracciati ottenuti in HLM esposti alla soluzione Na^+ -free (Controllo) o preincubati con il CB-DMB prima della perfusione con la soluzione Na^+ -free. Il CB-DMB blocca completamente l'influsso del Ca^{2+} indotto dalla soluzione Na^+ -free negli HLM. Tali esperimenti sono stati effettuati anche sui monociti ed hanno esibito risultati analoghi (dati non mostrati). L'effetto del CB-DMB sulla $[Ca^{2+}]_i$ è stato quantificato registrando il segnale di 30-45 HLM e monociti in tre differenti esperimenti. La **Figura 8B** mostra che il CB-DMB abolisce la risposta in tutte le preparazioni di HLM e monociti analizzate. Questi dati dimostrano che l'influsso di Ca^{2+} è dovuto all'attivazione in modalità *reverse* di NCX e, quindi, che NCX espresso in HLM e monociti è funzionalmente attivo. Il CB-DMB è il derivato amiloridico più selettivo

per NCX e non mostra attività su altri trasportatori e canali del Na⁺ (Taglialatela, et al., 1988, Taglialatela, et al., 1990). Nelle nostre condizioni sperimentali, la scelta della concentrazione di CB-DMB da utilizzare per l'inibizione di NCX è stata effettuata valutando la K_i del composto, che risulta essere 7,3 μM (Annunziato, et al., 2004), e la concentrazione d'uso in altri modelli sperimentali (Andreeva, et al., 1991, Rogister, et al., 2001, Secondo, et al., 2007). Tuttavia, dal momento che i tempi di incubazione del CB-DMB in differenti modelli cellulari apparivano diversi, abbiamo effettuato una serie di esperimenti allo scopo di individuare i tempi di preincubazione che nelle nostre condizioni sperimentali garantissero l'inibizione totale dello scambiatore. La **Figura 9** mostra i risultati ottenuti dall'osservazione di gruppi di cellule preincubati a tempi diversi con il CB-DMB (10 μM) e successivamente esposti alla soluzione extracellulare priva di Na⁺. Questi risultati indicano che, nelle popolazioni cellulari da noi esaminate, il derivato amiloridico CB-DMB è in grado di bloccare in maniera progressiva e tempo-dipendente l'attività di NCX. In particolare, per ottenere una inibizione completa di NCX è necessario un tempo di preincubazione pari a 60 minuti.

Effetto dell'inibizione della Ca²⁺-ATPasi del reticolo sarcoplasmatico sull'incremento della [Ca²⁺]_i indotta dal Na⁺-free in HLM e monociti

L'analisi dei tracciati corrispondenti all'attività di NCX in HLM e monociti (**Fig. 6**) indica che, in seguito all'influsso di Ca²⁺ indotto dalla soluzione Na⁺-free, la [Ca²⁺]_i ritorna ai livelli basali entro alcuni minuti. Tale fenomeno potrebbe essere dovuto al fatto che lo scambiatore, dopo l'iniziale attivazione in modalità *reverse*, a causa della depolarizzazione e dell'inversione delle concentrazioni transmembrinarie degli ioni Na⁺ e Ca²⁺, vada incontro ad uno switch nella modalità *forward*. Parimenti, l'influsso di Ca²⁺ potrebbe essere controbilanciato dall'attivazione di altri meccanismi di *buffering* presenti sulla membrana cellulare, come ad esempio la Ca²⁺ ATPasi del reticolo sarcoendoplasmatico (SERCA) (Carafoli, 1987). Allo scopo di chiarire i meccanismi coinvolti nel ripristino delle concentrazioni basali del Ca²⁺, gli HLM ed i monociti, prima dell'esposizione alla soluzione Na⁺-free, sono stati preincubati con tapsigargina, un inibitore specifico ed irreversibile della SERCA (Secondo, et al., 2007, Secondo, et al., 2000). La **Figura 10A** mostra che l'influsso di Ca²⁺ indotto dalla soluzione Na⁺-free negli HLM è notevolmente incrementato in presenza di tapsigargina ed ha una durata maggiore se confrontato con quello delle cellule non trattate con tapsigargina e perfuse con la soluzione Na⁺-free (Controllo). La

preincubazione delle cellule con CB-DMB (**Fig. 10B**) è ancora una volta in grado di inibire completamente l'incremento del Ca^{2+} Na^+ -dipendente anche in cellule trattate con taspigargina. Questi dati indicano che la SERCA si attiva precocemente e contemporaneamente all'attivazione in modalità *reverse* di NCX, controbilanciando l'incremento di calcio da esso mediato. Inoltre, essi suggeriscono che NCX non inverte il suo funzionamento in modalità *forward* una volta che sia stato attivato in modalità *reverse*. Tuttavia, questi dati non escludono la possibilità che NCX espresso da macrofagi e monociti possa funzionare in modalità *forward* in altre condizioni fisiopatologiche. Addirittura, è possibile ipotizzare che SERCA ed NCX possano cooperare al ripristino dell'omeostasi del Ca^{2+} dopo l'attivazione delle cellule da parte di altri stimoli che inducono un incremento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Valutazione dell'effetto dell'inibitore CB-DMB sulla vitalità degli HLM

Nella successiva serie di esperimenti è stato valutato l'effetto del CB-DMB sulla vitalità cellulare degli HLM, così da poter utilizzare questa molecola in altri protocolli sperimentali che prevedessero tempi di incubazione più lunghi di un'ora. In questi esperimenti, gli HLM sono stati incubati per tempi diversi (37C° , da 1 a 5 ore) con il CB-DMB $10\ \mu\text{M}$. La **Figura 11** mostra i risultati ottenuti dal saggio dell'MTT, che

utilizza come parametro di vitalità cellulare l'attività delle deidrogenasi mitocondriali. Il controllo positivo è rappresentato da cellule incubate con la soluzione Krebs Ringer, mentre il controllo negativo è dato da cellule trattate con il detergente Triton-X100 al 1%. Il CB-DMB incubato fino a 5 ore non influenza la vitalità cellulare degli HLM. Quindi i risultati dimostrano che il CB-DMB non esercita effetti tossici sui macrofagi polmonari.

Effetto della soluzione Na⁺-free sull'esocitosi e la produzione di citochine in HLM e monociti

Macrofagi e monociti utilizzano i segnali del Ca²⁺ per attivare funzioni cellulari fondamentali per le risposte infiammatorie. Queste funzioni includono la secrezione di mediatori preformati (esocitosi) (Triggiani, et al., 2001) e l'attivazione dell'espressione genica di citochine proinfiammatorie (Granata, et al., 2006). Quindi, nella successiva serie di esperimenti, abbiamo valutato gli effetti della esposizione alla soluzione Na⁺-free sulla secrezione di β -glucuronidasi, un enzima lisosomiale utilizzato come marcatore di esocitosi, e di TNF- α , una delle principali citochine prodotte dai macrofagi. La **Figura 12** mostra che l'incubazione degli HLM con la soluzione Na⁺-free per 4 ore non influenza la secrezione basale di β -glucuronidasi. Al contrario, la sPLA₂, utilizzata come controllo positivo (Granata, et al., 2006), induce

una significativa esocitosi dai macrofagi. La mancanza di effetto sull'esocitosi da parte della soluzione Na-free⁺ non è dovuto alla rimozione del Na⁺ dall'ambiente extracellulare. Infatti, l'incubazione dei macrofagi con la sPLA₂ in condizioni Na-free⁺ induce la secrezione di β-glucuronidasi in maniera del tutto analoga a quella indotta dalla sPLA₂ preparata in soluzione fisiologica. Questi risultati indicano che NCX non è apparentemente coinvolto nei meccanismi di esocitosi dei macrofagi.

In seguito, abbiamo esaminato gli effetti dell'esposizione degli HLM alla soluzione Na⁺-free sulla produzione di TNF-α, che rappresenta una delle citochine più importanti prodotte dai macrofagi e dai monociti. La **Figura 13** mostra che la soluzione Na⁺-free induce una significativa secrezione di TNF-α dai macrofagi. Questo effetto è pari a circa il 50% di quello indotto da LPS (1 μg/ml), utilizzato come controllo positivo. La preincubazione (60 min, 37°C) degli HLM con il CB-DMB, prima dell'esposizione alla soluzione Na⁺-free, blocca completamente il rilascio di TNF-α. Nelle stesse condizioni sperimentali, il CB-DMB non influenza il rilascio di TNF-α indotto da LPS. Questi risultati indicano che l'esposizione degli HLM alla soluzione Na⁺-free induce la produzione di TNF-α. Tale effetto è dovuto all'attivazione di NCX dal momento che il CB-DMB blocca il rilascio di TNF-α indotto dalla soluzione Na⁺-free, ma non quello indotto dal LPS. Nel loro insieme, questi risultati indicano che l'attivazione di NCX in modalità *reverse* non

induce il rilascio di mediatori preformati come la β -glucuronidasi, ma attiva la produzione di citochine proinfiammatorie sintetizzate *de novo* come il TNF- α .

DISCUSSIONE

Lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ rappresenta un elemento chiave nella regolazione delle concentrazioni intracellulari dello ione Ca^{2+} in diverse cellule eccitabili, dove riveste un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi intracellulare di tale ione. In questo studio abbiamo dimostrato per la prima volta che due popolazioni di cellule infiammatorie umane, i macrofagi polmonari ed i monociti circolanti, esprimono costitutivamente NCX1 e NCX3, ma non NCX2. In queste cellule, NCX è funzionalmente attivo, infatti la sua attivazione in risposta al gradiente del Na^+ è accoppiata all'incremento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$. L'attivazione di NCX in modalità *reverse* è in grado di indurre la produzione di citochine nei macrofagi umani.

Un punto di forza del nostro studio è rappresentato da un approccio sperimentale multiplo. Infatti, l'espressione delle varie isoforme di NCX è stata valutata a differenti livelli caratterizzando la trascrizione genica, la sintesi proteica e l'attività funzionale delle proteine. Nei macrofagi e nei monociti umani, è stato evidenziato che NCX1 e NCX3 sono espressi sia a livello di mRNA che di proteina e che essi scambiano Na^+ con Ca^{2+} generando un incremento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Nel nostro studio abbiamo preso in esame due tipi di cellule infiammatorie che rappresentano due differenti stadi di maturazione della

stessa linea ontogenetica. Infatti, si ritiene attualmente che i monociti circolanti si differenziano in macrofagi quando migrano nei differenti tessuti periferici (Strauss-Ayali, et al., 2007). Il fatto che sia NCX1 che NCX3 siano presenti nei monociti indica che NCX è espresso precocemente durante il programma di differenziamento della linea monocito-macrofagica umana. Nondimeno, l'espressione di queste proteine nei macrofagi implica che NCX venga conservato fino agli stadi finali della maturazione cellulare. L'insieme di queste evidenze sperimentali suggerisce che, nella popolazione monocito-macrofagica umana, NCX possa avere un ruolo importante nella modulazione di fondamentali attività immunocompetenti, comuni sia ai precursori circolanti, i monociti, che a cellule differenziate come i macrofagi polmonari. Dall'analisi densitometrica dei segnali ottenuti esaminando quantità equivalenti di cDNA e proteine degli HLM e dei monociti, abbiamo riscontrato che i livelli di NCX1 ed NCX3 risultano più elevati nei macrofagi rispetto ai monociti. Questi risultati suggeriscono che l'espressione di NCX1 e NCX3 nativi possa essere incrementata durante il processo di differenziamento dei monociti in macrofagi. Analizzando il profilo di immunoreattività della proteina NCX1 sono evidenti alcune differenze tra i due tipi cellulari. È interessante notare che i macrofagi sintetizzano una forma tronca di NCX1 (la banda di 70 kDa) assente nei monociti. Questa proteina tronca potrebbe rappresentare un frammento

proteolitico (Durkin, et al., 1991, Philipson, et al., 1988) derivante dal residuo carbossi-terminale (Iwata, et al., 1995) o da quello ammino-terminale (Gabellini, et al., 1995, Gabellini, et al., 1996) della proteina NCX1 nativa. In alternativa, essa potrebbe essere sintetizzata a partire da una forma circolarizzata di un trascritto dell'esone 2 di NCX, generato da un processo di splicing alternativo (Li and Lytton, 1999). In entrambi i casi descritti, è riportato che la forma tronca, nonostante la mancanza di alcuni segmenti transmembranari, conserva la capacità di scambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Saba, et al., 1999). Attualmente non è stato ancora chiarito se le forme tronche di NCX abbiano qualche significato fisiopatologico. Tuttavia, l'osservazione che una di queste forme sia espressa nei macrofagi, ma non nei monociti, indica che l'espressione di questa proteina sia selettivamente indotta durante il programma di differenziamento della linea monocito-macrofagica e suggerisce che essa possa essere importante per funzioni peculiari dei macrofagi. Il differenziamento dei monociti in macrofagi è caratterizzato dalla modulazione della sintesi di numerose proteine. Ad esempio, il nostro gruppo ha recentemente dimostrato che il differenziamento dei monociti in macrofagi è associato con la contemporanea *up-regulation* dei recettori istaminergici H_1 e la *down-regulation* dei recettori H_2 (Triggiani, et al., 2007). Quindi, è possibile ipotizzare che il differenziamento cellulare dei monociti in macrofagi possa risultare nella

up-regulation delle isoforme native di NCX1 e NCX3 e nell'induzione della forma tronca di NCX1. Comunque, saranno necessari altri studi per chiarire se specifiche isoforme di NCX possano avere un ruolo nel programma di differenziamento cellulare della linea monocito-macrofagica.

Nei tessuti umani, l'espressione di NCX è stata riportata nel cuore, nel SNC, nel rene, nel fegato, nel pancreas, nella muscolatura scheletrica, nella placenta, e nel polmone. Il nostro studio effettuato sui macrofagi polmonari dimostra che questo tipo cellulare può rappresentare una delle cellule che esprimono NCX nelle vie respiratorie umane. Inoltre, poiché i macrofagi sono ampiamente distribuiti in molti altri tessuti e considerando che NCX1 e NCX3 sono espressi anche nei loro precursori, i monociti, è possibile ipotizzare che i macrofagi rappresentino i siti di espressione di queste isoforme di NCX anche negli altri tessuti in cui è stata riportata la presenza di NCX (fegato, rene, pancreas, etc.).

L'espressione di NCX1 e NCX3 consente ai macrofagi ed ai monociti di rispondere al classico modello di attivazione di NCX, quale l'esposizione ad una soluzione extracellulare priva di Na^+ . Infatti, questi dati suggeriscono che nel complesso, le caratteristiche funzionali e farmacologiche dell'attività di scambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ osservate in macrofagi e monociti umani sono simili a quelle descritte in altre popolazioni

cellulari (cellule neuronali primarie (Tortiglione, et al., 2002) e cellule stabilmente transfettate (Secondo, et al., 2007).

Un importante risultato del nostro studio è la dimostrazione che l'attivazione di NCX in modalità *reverse* induce il rilascio di TNF- α , una delle citochine proinfiammatorie più importanti prodotte dai macrofagi. Tale evidenza sperimentale rappresenta la prima dimostrazione che questo scambiatore ionico è coinvolto in importanti funzioni delle cellule immunocompetenti. Il rilascio di TNF- α indotto dall'esposizione alla soluzione Na⁺-free nei macrofagi potrebbe essere mediato da meccanismi Ca²⁺-dipendenti che, attivati dall'incremento della [Ca²⁺]_i, funzionerebbero da trasduttori del segnale, inducendo il rilascio di TNF- α . Infatti, è noto che nei macrofagi il Ca²⁺ è coinvolto nella produzione di TNF- α ed altre citochine (Zhou, et al., 2006). Inoltre, molti tra gli stimoli che attivano la produzione di citochine generano un segnale mediato dal Ca²⁺. Comunque, questi stimoli incrementano il Ca²⁺ citoplasmatico attraverso meccanismi dipendenti dal consumo di energia, correlati alla formazione di intermedi cellulari (Granata, et al., 2006). Invece, il fatto che NCX possa incrementare la [Ca²⁺]_i senza dipendere da intermedi cellulari o consumo di energia consente ai macrofagi di produrre TNF- α anche quando gli altri meccanismi biochimici vengano compromessi dalla riduzione della disponibilità di ATP. Questo concetto può essere esteso ad altre funzioni dei monociti e macrofagi che

necessitano di segnali intracellulari Ca^{2+} dipendenti per il loro processi di attivazione. È importante notare che i segnali del Ca^{2+} generati nei macrofagi dall'esposizione alla soluzione Na^+ -free non sono in grado di indurre il rilascio di mediatori preformati come la β -glucuronidasi. Studi precedenti hanno mostrato che l'esocitosi dei granuli dalle cellule infiammatorie è un processo che può sia dipendere dal Ca^{2+} che avvenire attraverso segnali indipendenti da tale ione (Tapper and Sundler, 1995, Triggiani, et al., 2001). I nostri dati indicano che i processi di esocitosi nei macrofagi umani sono indipendenti da NCX. Comunque, l'osservazione che i segnali del Ca^{2+} mediati da NCX inducono il rilascio di $\text{TNF-}\alpha$, ma non di β -glucuronidasi, suggerisce che l'attivazione di NCX sia associata a specifiche funzioni dei macrofagi. Tuttavia, sono necessari altri studi per analizzare un possibile coinvolgimento di NCX in altre funzioni Ca^{2+} -dipendenti di queste cellule infiammatorie.

In conclusione, questo studio fornisce la prima evidenza che i macrofagi ed i monociti umani esprimono due isoforme di NCX funzionalmente attive. Questi scambiatori sono verosimilmente implicati in processi biologici fondamentali per i monociti/macrofagi. Questi dati confermano che il Ca^{2+} intracellulare riveste un ruolo importante in molte funzioni delle cellule fagocitiche nell'uomo. In questo senso, NCX si inserisce tra i meccanismi di regolazione dei livelli di Ca^{2+} nelle cellule infiammatorie umane accanto ai sistemi già riconosciuti (**Fig. 14**).

La possibilità che NCX sia coinvolto nella espressione ed attivazione di eventi fisiopatologici importanti (secrezione di citochine, differenziamento cellulare, etc.) suggerisce che questo scambiatore possa avere un ruolo importante nella regolazione delle risposte infiammatorie ed immuni.

BIBLIOGRAFIA

1. Alfonso A, Lago J, Botana MA, Vieytes MR, Botana LM. Characterization of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger on rat mast cells. Evidence for a functional role on the regulation of the cellular response. *Cell Physiol Biochem* 1999; 9:53-71.
2. Amoroso S, Gioielli A, Cataldi M, Di Renzo G, Annunziato L. In the neuronal cell line SH-SY5Y, oxidative stress-induced free radical overproduction causes cell death without any participation of intracellular Ca^{2+} increase. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1452:151-60.
3. Andreeva N, Khodorov B, Stelmashook E, Cragoe E, Jr., Victorov I. Inhibition of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange enhances delayed neuronal death elicited by glutamate in cerebellar granule cell cultures. *Brain Res* 1991; 548:322-5.
4. Aneiros E, Philipp S, Lis A, Freichel M, Cavalie A. Modulation of Ca^{2+} signaling by $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers in mast cells. *J Immunol* 2005; 174:119-30.
5. Annunziato L, Pignataro G, Di Renzo GF. Pharmacology of brain $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger: from molecular biology to therapeutic perspectives. *Pharmacol Rev* 2004; 56:633-54.
6. Asano S, Matsuda T, Takuma K, Kim HS, Sato T, Nishikawa T, et al. Nitroprusside and cyclic GMP stimulate $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange activity in neuronal preparations and cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 1995; 64:2437-41.

7. Baker PF, Blaustein MP. Sodium-dependent uptake of calcium by crab nerve. *Biochim Biophys Acta* 1968; 150:167-70.
8. Baker PF, Blaustein MP, Hodgkin AL, Steinhardt RA. The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J Physiol* 1969; 200:431-58.
9. Balasubramanyam M, Rohowsky-Kochan C, Reeves JP, Gardner JP. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange-mediated calcium entry in human lymphocytes. *J Clin Invest* 1994; 94:2002-8.
10. Beauvais F, Echasserieau K, Burtin C, Benveniste J. Regulation of human basophil activation; the role of Na^+ and Ca^{2+} in IL-3-induced potentiation of IgE-mediated histamine release from human basophils. *Clin Exp Immunol* 1994; 95:191-4.
11. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 1993; 361:315-25.
12. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1:11-21.
13. Blaustein MP. Calcium transport and buffering in neurons. *Trends Neurosci* 1988; 11:438-43.
14. Blaustein MP. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *Am J Physiol* 1993; 264:C1367-87.
15. Blaustein MP, Hodgkin AL. The effect of cyanide on the efflux of calcium from squid axons. *J Physiol* 1969; 200:497-527.
16. Blaustein MP, Lederer WJ. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 1999; 79:763-854.

17. Blaustein MP, Santiago EM. Effects of internal and external cations and of ATP on sodium-calcium and calcium-calcium exchange in squid axons. *Biophys J* 1977; 20:79-111.
18. Canitano A, Papa M, Boscia F, Castaldo P, Sellitti S, Tagliatela M, et al. Brain distribution of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger-encoding genes NCX1, NCX2, and NCX3 and their related proteins in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 976:394-404.
19. Carafoli E. Calcium homeostasis in excitable cells. *Biochem Soc Trans* 1988; 16:519-20.
20. Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:1115-22.
21. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 1987; 56:395-433.
22. Carafoli E. Membrane transport of calcium: an overview. *Methods Enzymol* 1988; 157:3-11.
23. Chakrabarti R, Chakrabarti R. Calcium signaling in non-excitabile cells: Ca²⁺ release and influx are independent events linked to two plasma membrane Ca²⁺ entry channels. *J Cell Biochem* 2006; 99:1503-16.
24. Clapham DE. Calcium signaling. *Cell* 1995; 80:259-68.
25. DiPolo R. Calcium influx in internally dialyzed squid giant axons. *J Gen Physiol* 1979; 73:91-113.
26. Dipolo R. Effect of ATP on the calcium efflux in dialyzed squid giant axons. *J Gen Physiol* 1974; 64:503-17.

27. DiPolo R, Beauge L. Differential up-regulation of Na⁺-Ca²⁺ exchange by phosphoarginine and ATP in dialysed squid axons. *J Physiol* 1998; 507 (Pt 3):737-47.
28. DiPolo R, Beauge L. In squid axons, ATP modulates Na⁺-Ca²⁺ exchange by a Ca²⁺-dependent phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1987; 897:347-54.
29. DiPolo R, Berberian G, Beauge L. Phosphoarginine regulation of the squid nerve Na⁺/Ca²⁺ exchanger: metabolic pathway and exchanger-ligand interactions different from those seen with ATP. *J Physiol* 2004; 554:387-401.
30. Doering AE, Nicoll DA, Lu Y, Lu L, Weiss JN, Philipson KD. Topology of a functionally important region of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 1998; 273:778-83.
31. Donnadieu E, Trautmann A. Is there a Na⁺/Ca²⁺ exchanger in macrophages and in lymphocytes? *Pflugers Arch* 1993; 424:448-55.
32. Durkin JT, Ahrens DC, Pan YC, Reeves JP. Purification and amino-terminal sequence of the bovine cardiac sodium-calcium exchanger: evidence for the presence of a signal sequence. *Arch Biochem Biophys* 1991; 290:369-75.
33. Fontana G, Rogowski RS, Blaustein MP. Kinetic properties of the sodium-calcium exchanger in rat brain synaptosomes. *J Physiol* 1995; 485 (Pt 2):349-64.

34. Gabellini N, Iwata T, Carafoli E. An alternative splicing site modifies the carboxyl-terminal trans-membrane domains of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 1995; 270:6917-24.
35. Gabellini N, Zatti A, Rispoli G, Navangione A, Carafoli E. Expression of an active Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoform lacking the six C-terminal transmembrane segments. *Eur J Biochem* 1996; 239:897-904.
36. Glitsch HG, Reuter H, Scholz H. The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. *J Physiol* 1970; 209:25-43.
37. Gordon S. The macrophage: Past, present, future. *European Journal of Immunology* 2007; 37:S9.
38. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:953-64.
39. Granata F, Frattini A, Loffredo S, Del Prete A, Sozzani S, Marone G, et al. Signaling events involved in cytokine and chemokine production induced by secretory phospholipase A2 in human lung macrophages. *Eur J Immunol* 2006; 36:1938-50.
40. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260:3440-50.
41. Haddock PS, Coetzee WA, Cho E, Porter L, Katoh H, Bers DM, et al. Subcellular [Ca²⁺]_i gradients during excitation-contraction coupling in newborn rabbit ventricular myocytes. *Circ Res* 1999; 85:415-27.

42. Hansen M, Nielsen S.E, Berg K. Re-examination and further development of a precise and dye method for measuring cell growth/celle killing. *J Immunol Meth* 1985; 119:203.
43. Hilgemann DW. Regulation and deregulation of cardiac Na(+)-Ca²⁺ exchange in giant excised sarcolemmal membrane patches. *Nature* 1990; 344:242-5.
44. Hilgemann DW, Ball R. Regulation of cardiac Na⁺,Ca²⁺ exchange and KATP potassium channels by PIP₂. *Science* 1996; 273:956-9.
45. Hilgemann DW, Collins A, Matsuoka S. Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. *J Gen Physiol* 1992; 100:933-61.
46. Hoyal CR, Giron-Calle J, Forman HJ. The alveolar macrophage as a model of calcium signaling in oxidative stress. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 1998; 1:117-34.
47. Iwamoto T. Forefront of Na⁺/Ca²⁺ exchanger studies: molecular pharmacology of Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitors. *J Pharmacol Sci* 2004; 96:27-32.
48. Iwamoto T, Uehara A, Imanaga I, Shigekawa M. The Na⁺/Ca²⁺ exchanger NCX1 has oppositely oriented reentrant loop domains that contain conserved aspartic acids whose mutation alters its apparent Ca²⁺ affinity. *J Biol Chem* 2000; 275:38571-80.
49. Iwata T, Galli C, Dainese P, Guerini D, Carafoli E. The 70 kD component of the heart sarcolemmal Na⁺/Ca(2+)-exchanger preparation is the C-terminal portion of the protein. *Cell Calcium* 1995; 17:263-9.

50. Kita S, Furuta A, Takano Y, Iwamoto T. The role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in endothelin-1-aggravated hypoxia/reoxygenation-induced injury in renal epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1099:473-7.
51. Lago J, Alfonso A, Vieytes MR, Botana LM. Ouabain-induced enhancement of rat mast cells response. Modulation by protein phosphorylation and intracellular pH. *Cell Signal* 2001; 13:515-24.
52. Laver DR. Ca²⁺ stores regulate ryanodine receptor Ca²⁺ release channels via luminal and cytosolic Ca²⁺ sites. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34:889-96.
53. Leblanc N, Hume JR. Sodium current-induced release of calcium from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Science* 1990; 248:372-6.
54. Lee SL, Yu AS, Lytton J. Tissue-specific expression of Na(+)-Ca²⁺ exchanger isoforms. *J Biol Chem* 1994; 269:14849-52.
55. Li XF, Lytton J. A circularized sodium-calcium exchanger exon 2 transcript. *J Biol Chem* 1999; 274:8153-60.
56. Li Z, Matsuoka S, Hryshko LV, Nicoll DA, Bersohn MM, Burke EP, et al. Cloning of the NCX2 isoform of the plasma membrane Na(+)-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 1994; 269:17434-9.
57. Li Z, Nicoll DA, Collins A, Hilgemann DW, Filoteo AG, Penniston JT, et al. Identification of a peptide inhibitor of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 1991; 266:1014-20.
58. Linck B, Qiu Z, He Z, Tong Q, Hilgemann DW, Philipson KD. Functional comparison of the three isoforms of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX1, NCX2, NCX3). *Am J Physiol* 1998; 274:C415-23.

59. Lohmann-Matthes ML, Steinmuller C, Franke-Ullmann G. Pulmonary macrophages. *Eur Respir J* 1994; 7:1678-89.
60. Luttgau HC, Niedergerke R. The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. *J Physiol* 1958; 143:486-505.
61. Magi S, Castaldo P, Carrieri G, Scorziello A, Di Renzo G, Amoroso S. Involvement of Na⁺-Ca²⁺ exchanger in intracellular Ca²⁺ increase and neuronal injury induced by polychlorinated biphenyls in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315:291-6.
62. Martin DL, DeLuca HF. Influence of sodium on calcium transport by the rat small intestine. *Am J Physiol* 1969; 216:1351-9.
63. McCusker K, Hoidal J. Characterization of scavenger receptor activity in resident human lung macrophages. *Exp Lung Res* 1989; 15:651-61.
64. Meldolesi J, Madeddu L, Pozzan T. Intracellular Ca²⁺ storage organelles in non-muscle cells: heterogeneity and functional assignment. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1055:130-40.
65. Mikoshiba K. IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem* 2007; 102:1426-46.
66. Milanick MA, Frame MD. Kinetic models of Na-Ca exchange in ferret red blood cells. Interaction of intracellular Na, extracellular Ca, Cd, and Mn. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 639:604-15.
67. Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79:319-26.

68. Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *Science* 1990; 250:562-5.
69. Nicoll DA, Ottolia M, Lu L, Lu Y, Philipson KD. A new topological model of the cardiac sarcolemmal Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 1999; 274:910-7.
70. Nicoll DA, Quednau BD, Qui Z, Xia YR, Lysis AJ, Philipson KD. Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3. *J Biol Chem* 1996; 271:24914-21.
71. Niedergerke R. Movements of Ca in beating ventricles of the frog heart. *J Physiol* 1963; 167:551-80.
72. Ottolia M, John S, Qiu Z, Philipson KD. Split Na⁺-Ca²⁺ exchangers. Implications for function and expression. *J Biol Chem* 2001; 276:19603-9.
73. Palecanda A, Paulauskis J, Al-Mutairi E, Imrich A, Qin G, Suzuki H, et al. Role of the scavenger receptor MARCO in alveolar macrophage binding of unopsonized environmental particles. *J Exp Med* 1999; 189:1497-506.
74. Papa M, Canitano A, Boscia F, Castaldo P, Sellitti S, Porzig H, et al. Differential expression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger transcripts and proteins in rat brain regions. *J Comp Neurol* 2003; 461:31-48.
75. Pearson HA. Calcium channel subtypes--another layer of complexity to an already intricate story. *J Physiol* 2007; 578:629.

76. Philipson KD, Longoni S, Ward R. Purification of the cardiac Na⁺-Ca²⁺ exchange protein. *Biochim Biophys Acta* 1988; 945:298-306.
77. Philipson KD, Nicoll DA. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol* 2000; 62:111-33.
78. Philipson KD, Nicoll DA, Ottolia M, Quednau BD, Reuter H, John S, et al. The Na⁺/Ca²⁺ exchange molecule: an overview. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 976:1-10.
79. Pignataro G, Gala R, Cuomo O, Tortiglione A, Giaccio L, Castaldo P, et al. Two sodium/calcium exchanger gene products, NCX1 and NCX3, play a major role in the development of permanent focal cerebral ischemia. *Stroke* 2004; 35:2566-70.
80. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P, Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 1994; 74:595-636.
81. Qiu Z, Nicoll DA, Philipson KD. Helix packing of functionally important regions of the cardiac Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ exchanger. *J Biol Chem* 2001; 276:194-9.
82. Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD. The sodium/calcium exchanger family-SLC8. *Pflugers Arch* 2004; 447:543-8.
83. Quednau BD, Nicoll DA, Philipson KD. Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. *Am J Physiol* 1997; 272:C1250-61.
84. Quinn JM, Gillespie MT. Modulation of osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328:739-45.

85. Randriamampita C, Trautmann A. Arachidonic acid activates Ca^{2+} extrusion in macrophages. *J Biol Chem* 1990; 265:18059-62.
86. Reuter H, Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 1968; 195:451-70.
87. Rogister F, Laeckmann D, Plasman P, Van Eylen F, Ghyoot M, Maggetto C, et al. Novel inhibitors of the sodium-calcium exchanger: benzene ring analogues of N-guanidino substituted amiloride derivatives. *Eur J Med Chem* 2001; 36:597-614.
88. Rumpel E, Pilatus U, Mayer A, Pecht I. Na^{+} -dependent Ca^{2+} transport modulates the secretory response to the Fcepsilon receptor stimulus of mast cells. *Biophys J* 2000; 79:2975-86.
89. Saba RI, Bollen A, Herchuelz A. Characterization of the 70 kDa polypeptide of the Na/Ca exchanger. *Biochem J* 1999; 338 (Pt 1):139-45.
90. Schwarz EM, Benzer S. Calx, a Na-Ca exchanger gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:10249-54.
91. Secondo A, Staiano RI, Scorziello A, Sirabella R, Boscia F, Adornetto A, et al. BHK cells transfected with NCX3 are more resistant to hypoxia followed by reoxygenation than those transfected with NCX1 and NCX2: Possible relationship with mitochondrial membrane potential. *Cell Calcium* 2007; 42:521-35.
92. Secondo A, Taglialatela M, Cataldi M, Giorgio G, Valore M, Di Renzo G, et al. Pharmacological blockade of ERG K^{+} channels and Ca^{2+}

- influx through store-operated channels exerts opposite effects on intracellular Ca^{2+} oscillations in pituitary GH(3) cells. *Mol Pharmacol* 2000; 58:1115-28.
93. Shigekawa M, Iwamoto T. Cardiac Na^{+} - Ca^{2+} exchange: molecular and pharmacological aspects. *Circ Res* 2001; 88:864-76.
 94. Simchowicz L, Cragoe EJ, Jr. Na^{+} - Ca^{2+} exchange in human neutrophils. *Am J Physiol* 1988; 254:C150-64.
 95. Snedecor GW. *Statistical Methods*,. Iowa State University Press 1980; Ames.
 96. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol* 2007; 82:244-52.
 97. Tagliatela M, Amoroso S, Canzoniero LM, Di Renzo GF, Annunziato L. Membrane events and ionic processes involved in dopamine release from tuberoinfundibular neurons. II. Effect of the inhibition of the Na^{+} - Ca^{++} exchange by amiloride. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246:689-94.
 98. Tagliatela M, Canzoniero LM, Cragoe EJ, Jr., Di Renzo G, Annunziato L. Na^{+} - Ca^{2+} exchange activity in central nerve endings. II. Relationship between pharmacological blockade by amiloride analogues and dopamine release from tuberoinfundibular hypothalamic neurons. *Mol Pharmacol* 1990; 38:393-400.
 99. Tapper H, Sundler R. Protein kinase C and intracellular pH regulate zymosan-induced lysosomal enzyme secretion in macrophages. *J Leukoc Biol* 1995; 58:485-94.

100. Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, et al. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 2002; 169:3876-82.
101. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:901-44.
102. Tedeschi A, Palella M, Milazzo N, Lorini M, Miadonna A. IL-3-induced histamine release from human basophils. Dissociation from cationic dye binding and down-regulation by Na⁺ and K⁺. *J Immunol* 1995; 155:2652-60.
103. Tintinger GR, Anderson R. Counteracting effects of NADPH oxidase and the Na⁺/Ca²⁺ exchanger on membrane repolarisation and store-operated uptake of Ca²⁺ by chemoattractant-activated human neutrophils. *Biochem Pharmacol* 2004; 67:2263-71.
104. Tortiglione A, Pignataro G, Minale M, Secondo A, Scorziello A, Di Renzo GF, et al. Na⁺/Ca²⁺ exchanger in Na⁺ efflux-Ca²⁺ influx mode of operation exerts a neuroprotective role in cellular models of in vitro anoxia and in vivo cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 976:408-12.
105. Triggiani M, Gentile M, Secondo A, Granata F, Oriente A, Taglialatela M, et al. Histamine induces exocytosis and IL-6 production from human lung macrophages through interaction with H1 receptors. *J Immunol* 2001; 166:4083-91.

106. Triggiani M, Granata F, Oriente A, De Marino V, Gentile M, Calabrese C, et al. Secretory phospholipases A2 induce beta-glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages. *J Immunol* 2000; 164:4908-15.
107. Triggiani M, Granata F, Oriente A, Gentile M, Petraroli A, Balestrieri B, et al. Secretory phospholipases A2 induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes. *Eur J Immunol* 2002; 32:67-76.
108. Triggiani M, Petraroli A, Loffredo S, Frattini A, Granata F, Morabito P, et al. Differentiation of monocytes into macrophages induces the upregulation of histamine H1 receptor. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:472-81.
109. Tsien RY. Fluorescence measurement and photochemical manipulation of cytosolic free calcium. *Trends Neurosci* 1988; 11:419-24.
110. Umino T, Skold CM, Pirruccello SJ, Spurzem JR, Rennard SI. Two-colour flow-cytometric analysis of pulmonary alveolar macrophages from smokers. *Eur Respir J* 1999; 13:894-9.
111. Van Eylen F, Kamagate A, Herchuelz A. A new Na/Ca exchanger splicing pattern identified in situ leads to a functionally active 70kDa NH(2)-terminal protein. *Cell Calcium* 2001; 30:191-8.
112. Wacholtz MC, Cragoe EJ, Jr., Lipsky PE. A Na(+)-dependent Ca²⁺ exchanger generates the sustained increase in intracellular Ca²⁺ required for T cell activation. *J Immunol* 1992; 149:1912-20.

113. Wakabayashi S, Goshima K. Kinetic studies on sodium-dependent calcium uptake by myocardial cells and neuroblastoma cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1981; 642:158-72.
114. Wang J, Schwinger RH, Frank K, Muller-Ehmsen J, Martin-Vasallo P, Pressley TA, et al. Regional expression of sodium pump subunits isoforms and Na⁺-Ca⁺⁺ exchanger in the human heart. *J Clin Invest* 1996; 98:1650-8.
115. Yu L, Colvin RA. Regional differences in expression of transcripts for Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 50:285-92.
116. Zhou X, Yang W, Li J. Ca²⁺- and protein kinase C-dependent signaling pathway for nuclear factor-kappaB activation, inducible nitric-oxide synthase expression, and tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated rat peritoneal macrophages. *J Biol Chem* 2006; 281:31337-47.

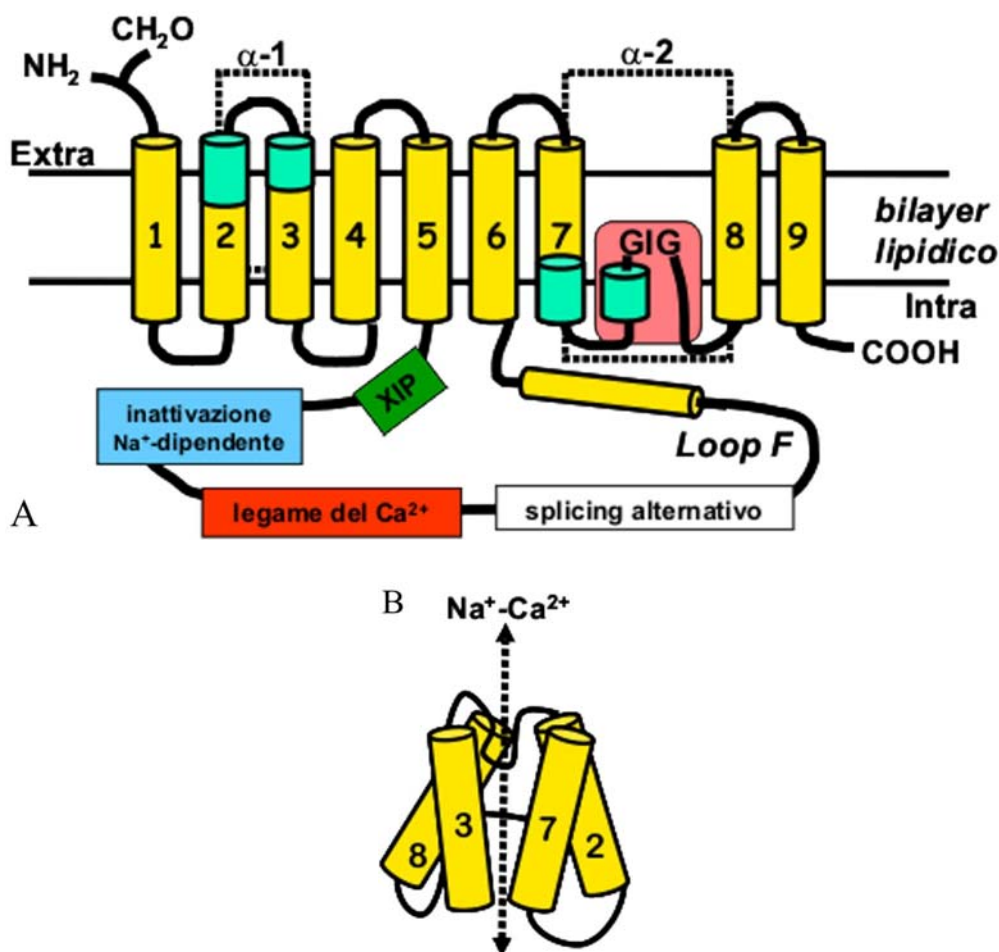
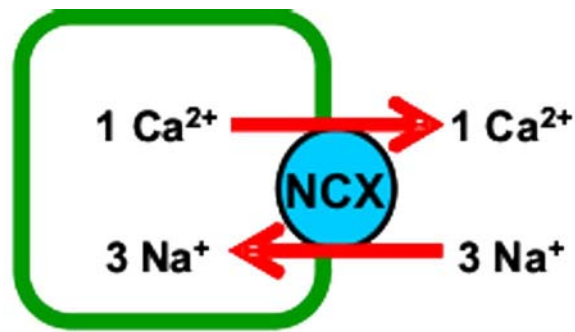
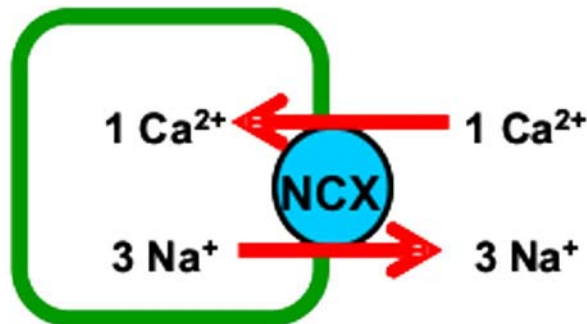


Figura 1. Modello strutturale dello Scambiatore $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).

NCX è costituito da nove segmenti transmembranari (TMS, indicati in giallo), compresi tra un dominio aminoterminale extracellulare ed un dominio carbossiterminale intracellulare. Il TMS5 ed il TMS6 sono connessi da un largo loop citoplasmatico (*loop f*), sede di regioni regolatorie per l'attività dello scambiatore: 1) il peptide endogeno di inibizione (XIP) (verde), 2) il sito di in attivazione Na^+ -dipendente (azzurro), 3) il sito di legame per il Ca^{2+} regolatorio (rosso) e 4) le regioni per lo splicing alternativo (bianco). I TMS2 e TMS3, insieme al loro loop di connessione e i TMS7 e 8, insieme alla porzione carbossiterminale adiacente, formano le regioni α -repeat (indicate dalla linea tratteggiata), che si contrappongono durante il ripiegamento della proteina, a formare due tasche ai lati opposti della membrana che sono coinvolte nel trasporto ionico (pannello B).



Modalità *Forward*:
influsso di Na⁺/ efflusso di Ca²⁺



Modalità *Reverse*:
efflusso di Na⁺/influsso di Ca²⁺

Figura 2. Modalità di scambio Na⁺-Ca²⁺.

NCX funziona secondo un meccanismo di controtrasporto ionico bidirezionale, che scambia 3 ioni Na⁺ con uno ione Ca²⁺, secondo due modalità. Il pannello superiore mostra la modalità di trasporto *forward*, in cui l'estrusione del Ca²⁺ è accoppiata all'internalizzazione del Na⁺. Il pannello inferiore mostra la modalità *reverse*, in cui l'internalizzazione del Ca²⁺ è associata all'estrusione del Na⁺. La modalità del trasporto dipende dal gradiente transmembrana dei due ioni.

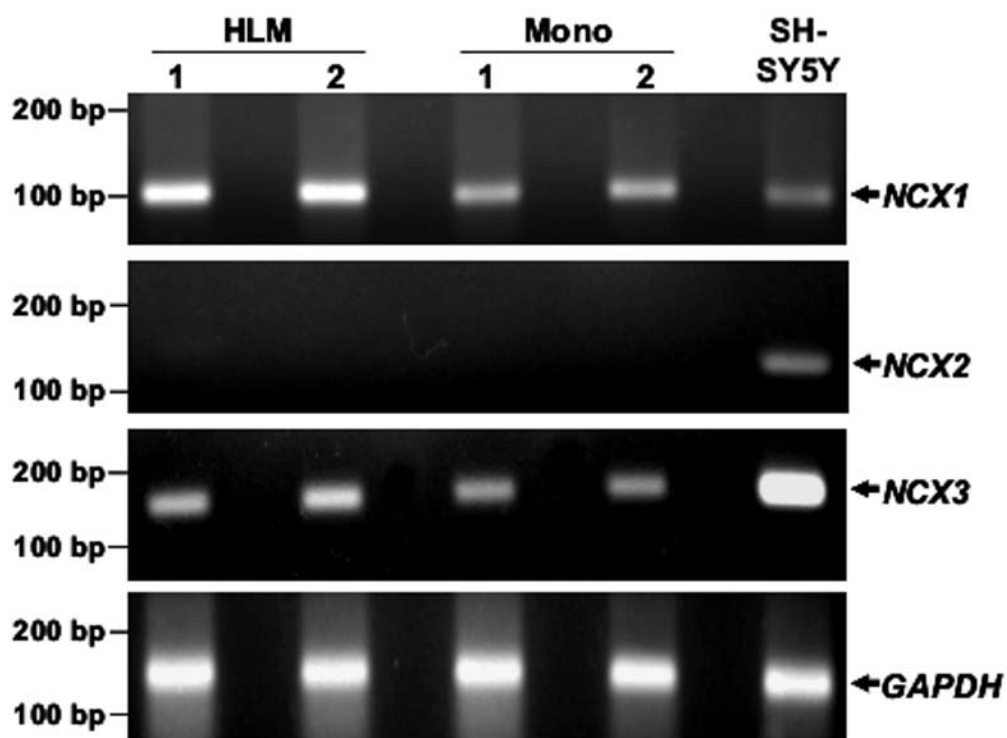


Figura 3. Espressione dell'mRNA per NCX1, NCX2 e NCX3 in HLM e monociti.
 RT-PCR semiquantitativa dei prodotti di amplificazione specifici per NCX1 (prima riga), NCX2 (seconda riga), NCX3 (terza riga) e GAPDH (quarta riga) di due diverse preparazioni di HLM e monociti (Mono). Le cellule SH-SY5Y sono state utilizzate come controllo positivo. Uno standard di DNA di 100 bp è stato utilizzato per la valutazione del numero di basi dei prodotti di amplificazione.

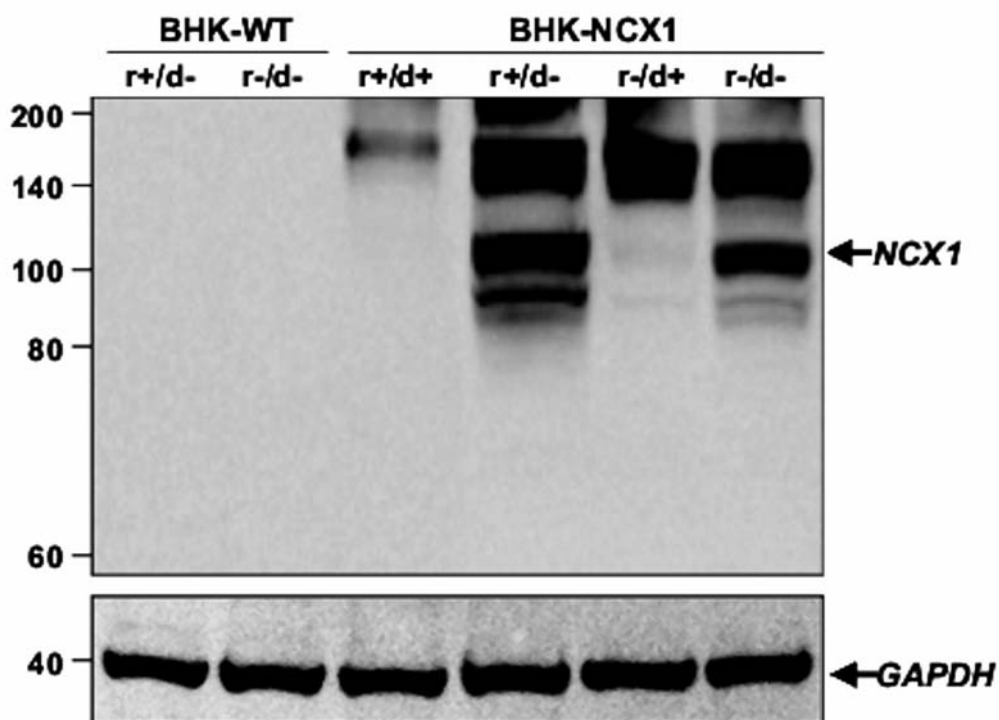


Figura 4. Espressione proteica di NCX1 in cellule BHK transfettate con NCX1.

Gli estratti proteici (40 μg per campione) di cellule BHK-*wild type* (BHK-WT) e BHK transfettate con NCX1 (BHK-NCX1) esposti a diverse condizioni di riduzione e/o denaturazione, sono stati analizzati mediante western blot con un anticorpo anti-NCX1. La riduzione delle proteine è stata ottenuta con β -mercaptoetanolo (r+) e la denaturazione (d+) è stata ottenuta mediante bollitura per 5 minuti. Le membrane strippate sono state incubate successivamente con un anticorpo anti-GAPDH per verificare che il contenuto di proteine fosse equivalente in ogni campione.

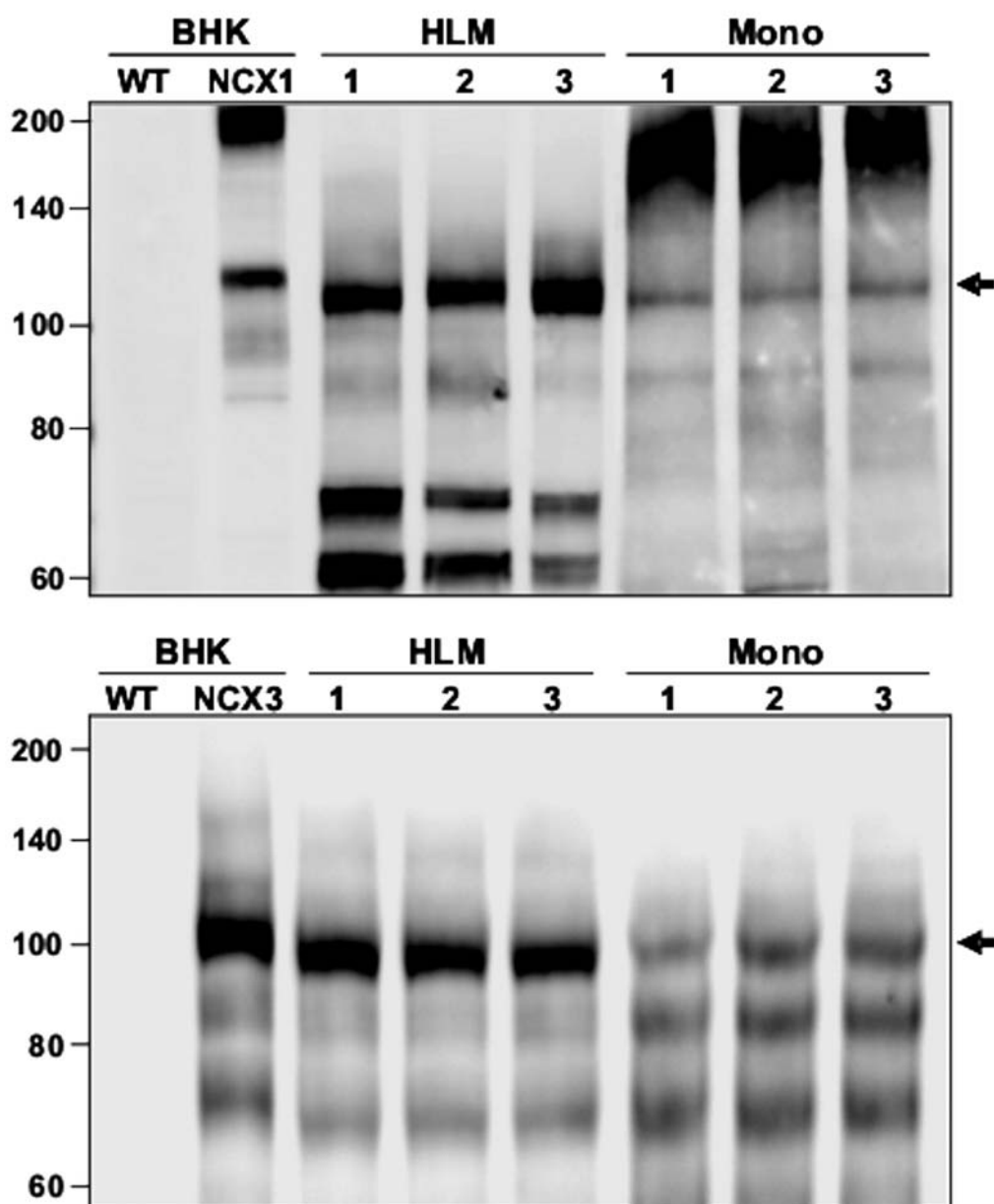


Figura 5. Espressione proteica di NCX1 e NCX3 in HLM e monociti.

Western blot della proteina NCX1 (pannello superiore) e NCX3 (pannello inferiore) in lisati cellulari di tre diverse preparazioni di HLM e monociti (Mono). Le cellule BHK stabilmente transfettate con NCX1 o NCX3 sono state utilizzate come controlli positivi nei rispettivi pannelli. In entrambi i gel sono stati caricati 40 μ g di lisati cellulari per ogni campione di HLM e monociti.

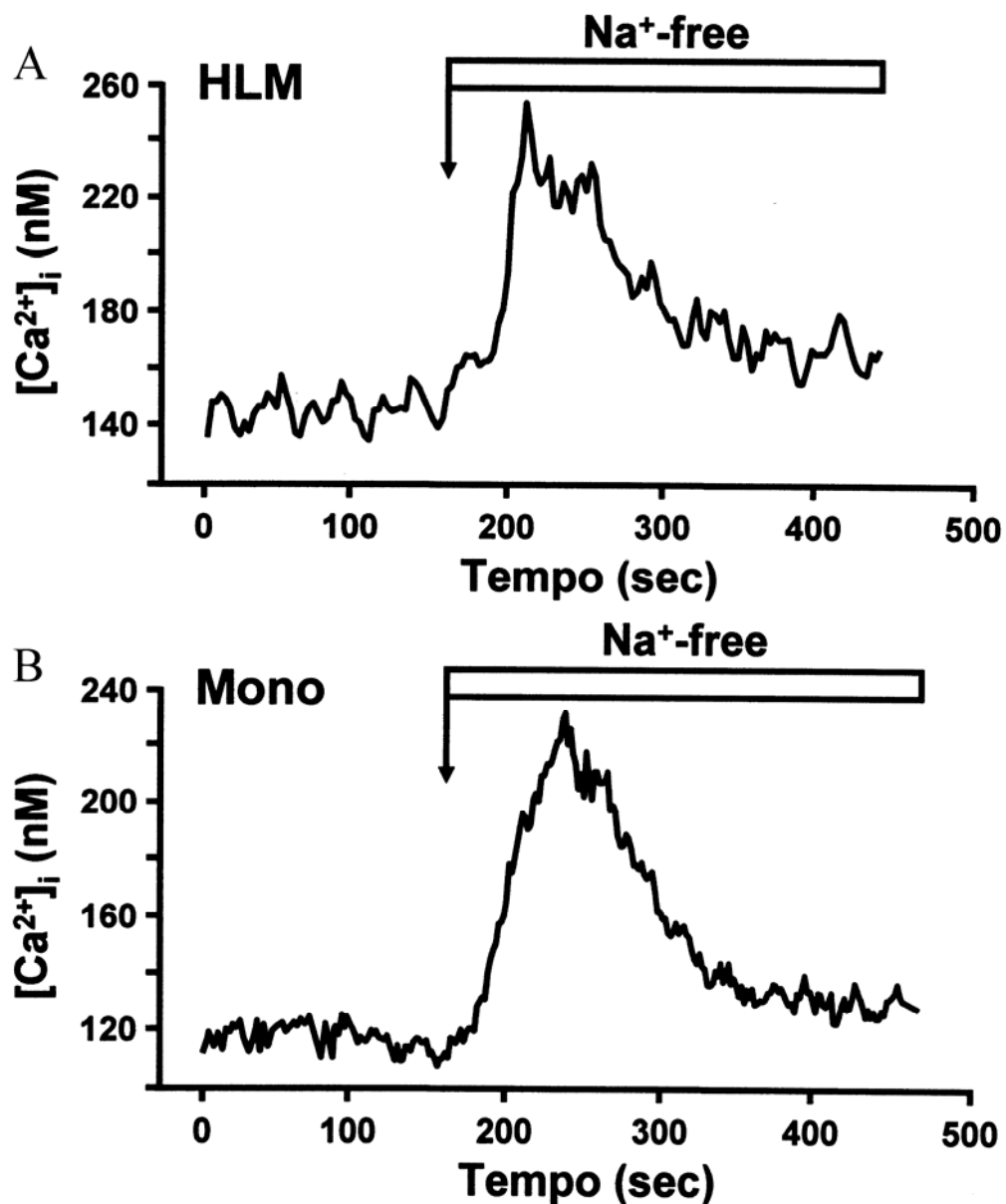


Figura 6. Effetto della esposizione di HLM e monociti ad una soluzione priva di Na^+ (Na^+ -free) sulla concentrazione intracellulare di Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$).

Gli HLM (pannello A) ed i monociti (pannello B) sono stati preincubati ($37^\circ C$, 1 ora) con FURA 2-AM ($3\mu M$) e quindi esposti ad una soluzione Na^+ -free per il tempo indicato dalle barre. L'attività di NCX è stata valutata in modalità *reverse*, registrando le variazioni della $[Ca^{2+}]_i$. I tracciati mostrati sono rappresentativi di quelli ottenuti monitorando almeno 100 cellule, osservate in tre diversi esperimenti.

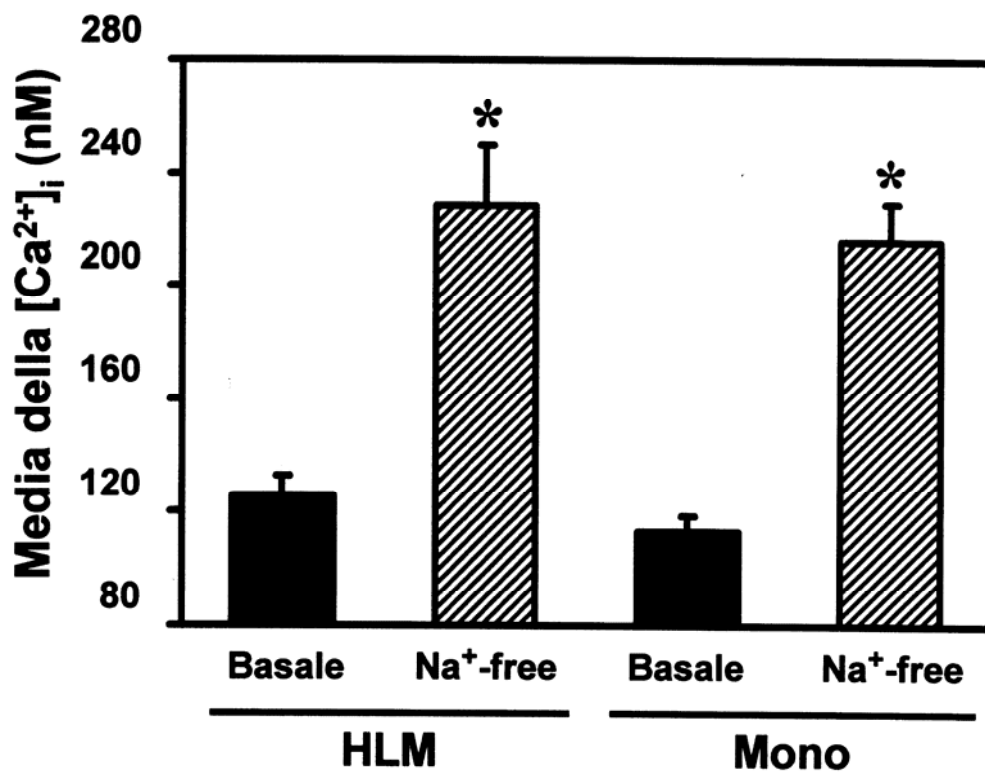


Figura 7. Quantificazione dell'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ in seguito all'attivazione dello scambiatore Na^+/Ca^{2+} in HLM e monociti.

Il grafico riporta i valori delle $[Ca^{2+}]_i$ registrate in HLM e monociti prima (barre nere) e dopo (barre a righe) l'esposizione delle cellule alla soluzione Na^+ -free. I valori rappresentano la media \pm ES di tre esperimenti. * $p < 0.05$ rispetto alle rispettive cellule di controllo (basale).

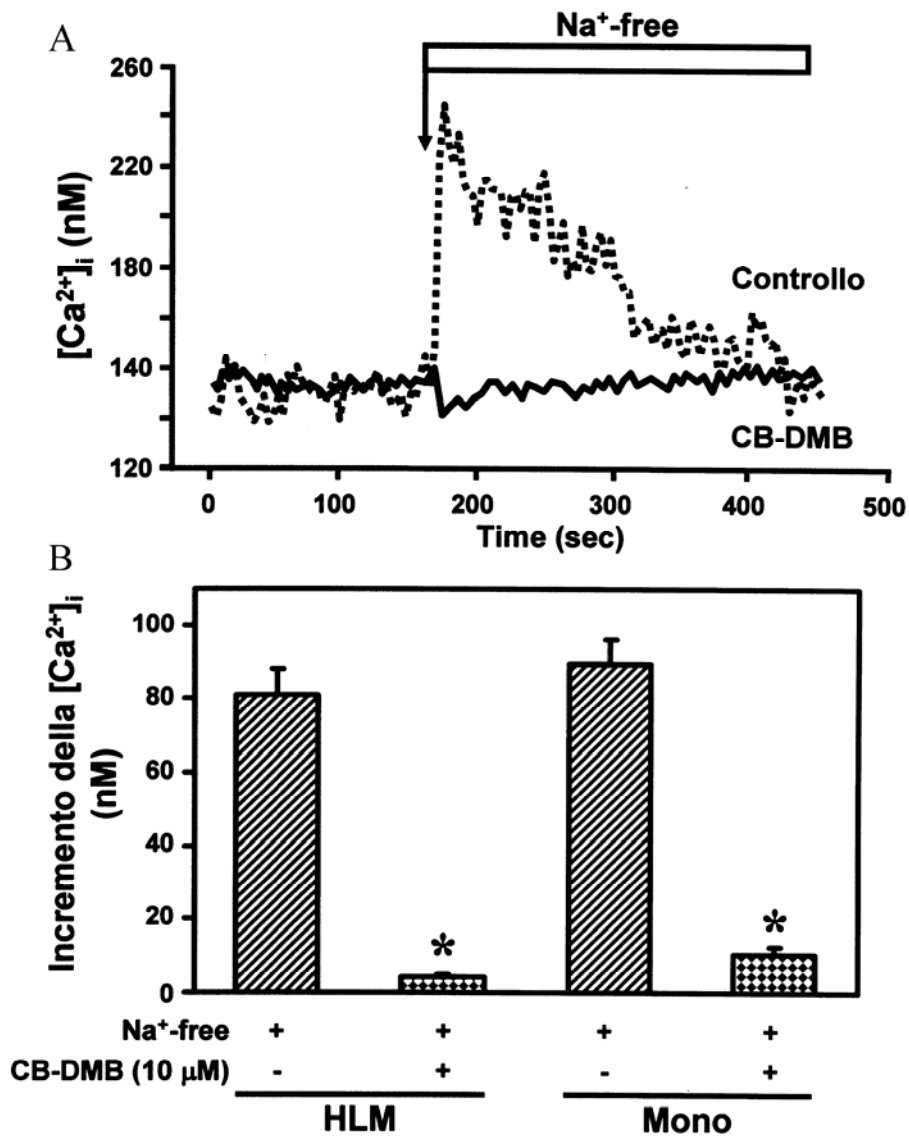


Figura. 8 Effetto del CB-DMB sull'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ indotta dalla soluzione Na^+ -free negli HLM.

Pannello A: Gli HLM sono stati incubati (1 ora, 37°C) in presenza (linea continua) o assenza (linea tratteggiata) di CB-DMB 10 μM. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state esposte ad una soluzione Na^+ -free e l'attività di NCX è stata valutata registrando le variazioni della $[Ca^{2+}]_i$.

Pannello B: Incremento delle $[Ca^{2+}]_i$ registrate in HLM e monociti incubati (1 ora, 37°C) in presenza o assenza di CB-DMB 10 μM e quindi esposti alla soluzione Na^+ -free. I valori rappresentano la media ± ES di tre esperimenti. * $p < 0.05$ rispetto alle rispettive cellule non trattate con CB-DMB.

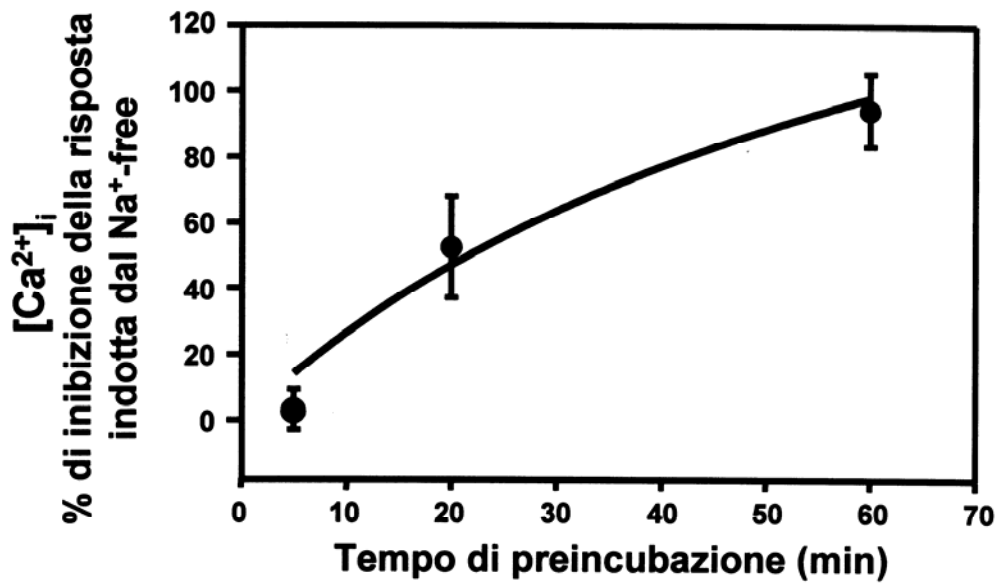


Figura 9. Cinetica di inibizione del CB-DMB.

Gli HLM sono stati preincubati per tempi diversi (5-60 min, 37°C) con CB-DMB 10 μ M e quindi esposti ad una soluzione Na⁺-free. L'attività di NCX è stata valutata registrando le variazioni della $[Ca^{2+}]_i$. I valori riportati nel grafico sono espressi come percentuale di inibizione dell'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ indotto dalla soluzione Na⁺-free in cellule non trattate con CB-DMB. Il valori rappresentano la media \pm ES di tre esperimenti.

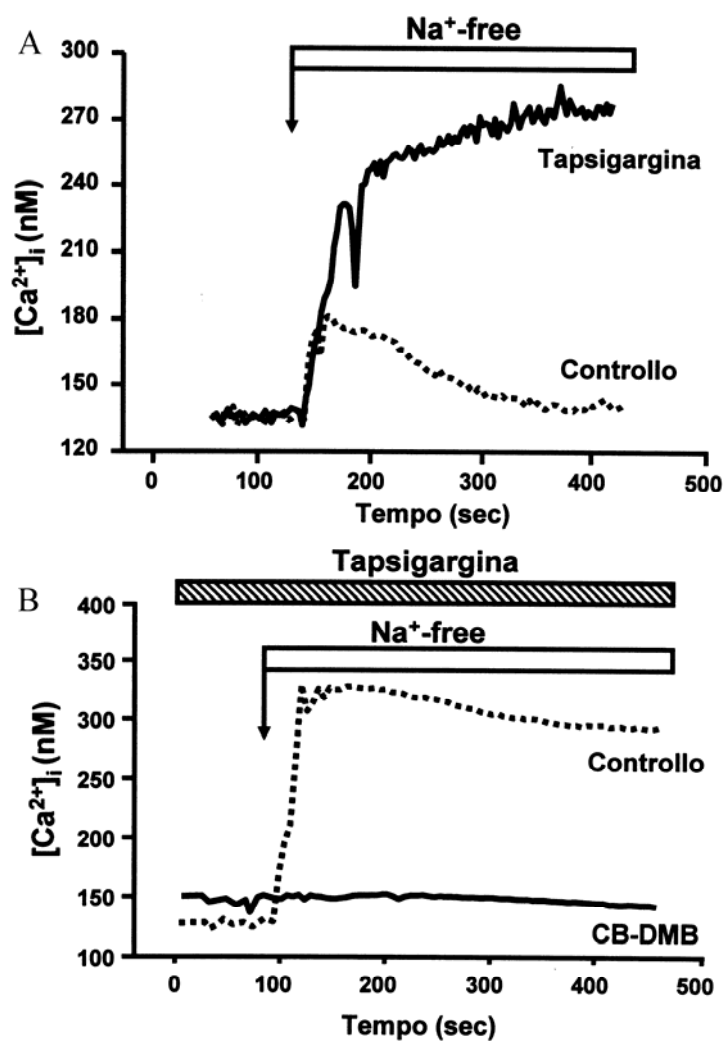


Fig 10. Effetto della thapsigargina sull'incremento della $[Ca^{2+}]_i$ indotta dalla soluzione Na^+ -free negli HLM

Pannello A: Gli HLM sono stati esposti ad una soluzione Na^+ -free in presenza (linea continua) o assenza (linea tratteggiata) di thapsigargina (1 μ M). L'attività di NCX è stata valutata registrando le variazioni della $[Ca^{2+}]_i$.

Pannello B: Gli HLM sono stati incubati (1 ora, 37°C) con (linea continua) o senza (linea tratteggiata) CB-DMB 10 μ M. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state esposte ad una soluzione Na^+ -free in presenza di thapsigargina (1 μ M). L'attività di NCX è stata valutata registrando le variazioni della $[Ca^{2+}]_i$.

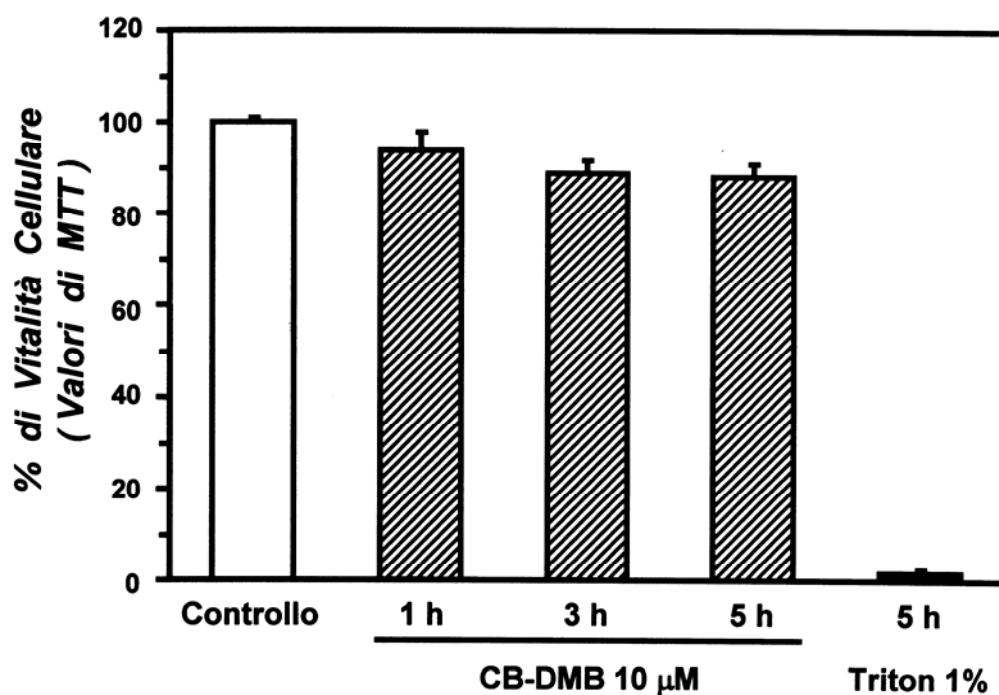


Figura 11. Valutazione della vitalità cellulare in seguito ad esposizione al CB-DMB.

Gli HLM sono stati incubati (1-5 ore, 37°C) con CB-DMB 10 µM, Triton X-100 1% o mezzo di coltura (Controllo). Al termine dell'incubazione il soprannatante è stato rimosso e sulle cellule rimaste in piastra è stato effettuato il saggio dell'MTT (vedi sezione Materiali e Metodi). Il grafico mostra i valori \pm ES di vitalità cellulare, espressi come percentuale rispetto al controllo, ottenuti in tre esperimenti.

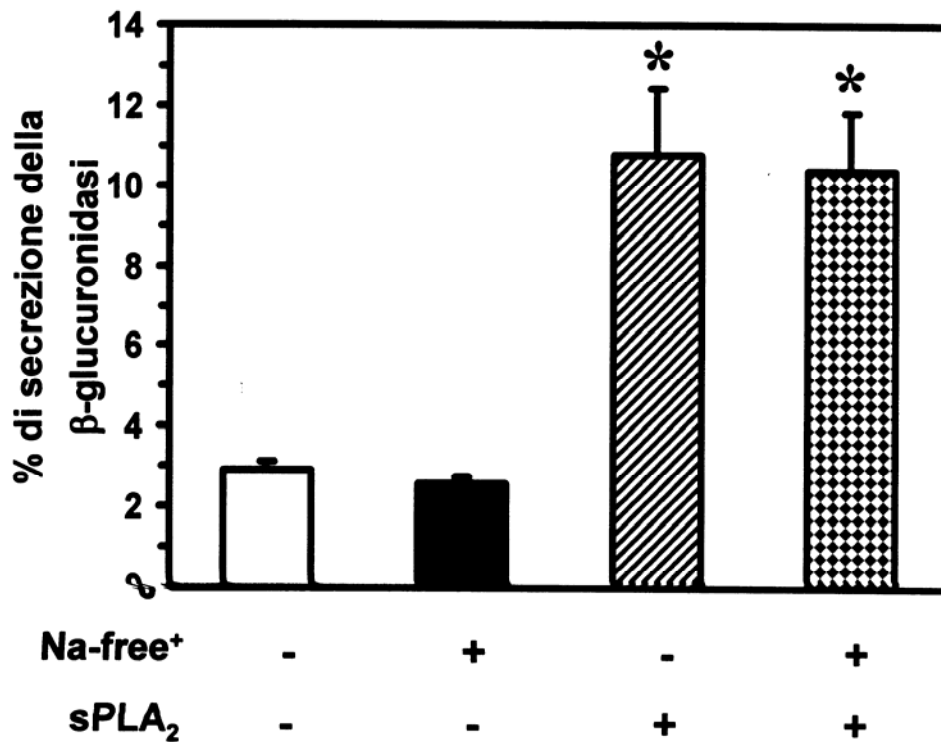


Figura 12. Effetto della soluzione Na⁺-free sulla secrezione di β-glucuronidasi dagli HLM.

Le cellule sono state incubate (4 ore, 37°C) con soluzione Na⁺-free, sPLA₂ (1μg/ml) preparata in soluzione Krebs Ringer e sPLA₂ (1μg/ml) preparata in soluzione Na⁺-free. Al termine dell'incubazione è stata valutata la secrezione di β-glucuronidasi. I valori sono espressi come percentuale rispetto al contenuto cellulare totale di β-glucuronidasi. I dati rappresentano la media ± ES di tre esperimenti. *p<0.05 vs. le cellule di controllo.

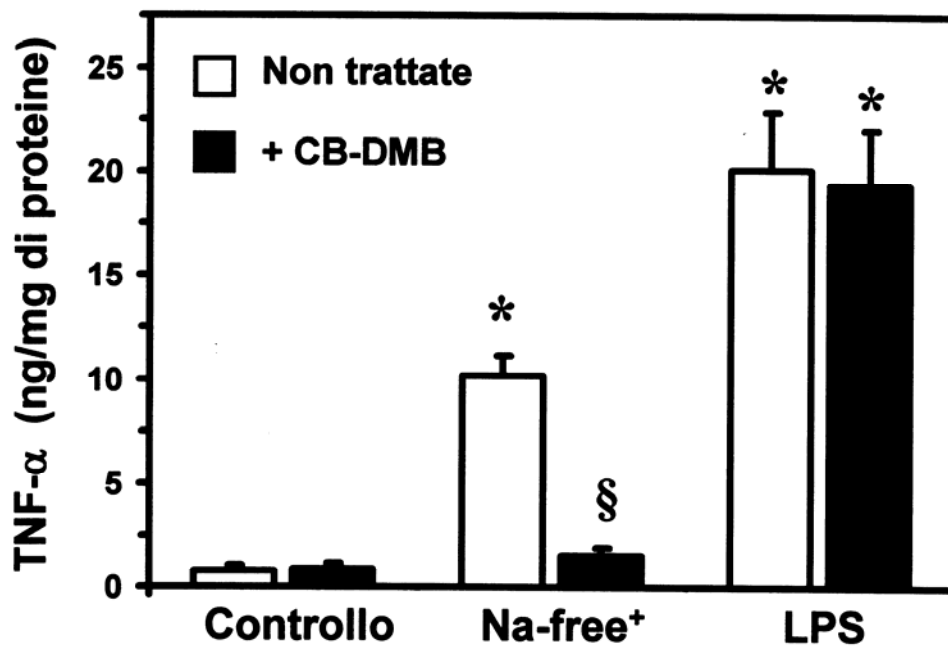


Figura 13. Effetto della soluzione Na⁺-free sulla secrezione di TNF- α dagli HLM. Le cellule sono state preincubate (1 ora, 37°C) in presenza (barre nere) o assenza (barre bianche) di CB-DMB (10 μ M) e quindi incubate (4 ore, 37°C) con soluzione Na⁺-free o LPS (1 μ g/ml) preparato in soluzione Krebs Ringer. La secrezione TNF- α è stata determinata nei sopranatanti mediante ELISA. I valori sono espressi come ng/mg di proteine totali. I dati rappresentano la media \pm ES di tre esperimenti. *p<0.05 vs. il controllo; §p<0.01 vs. Na⁺-free.

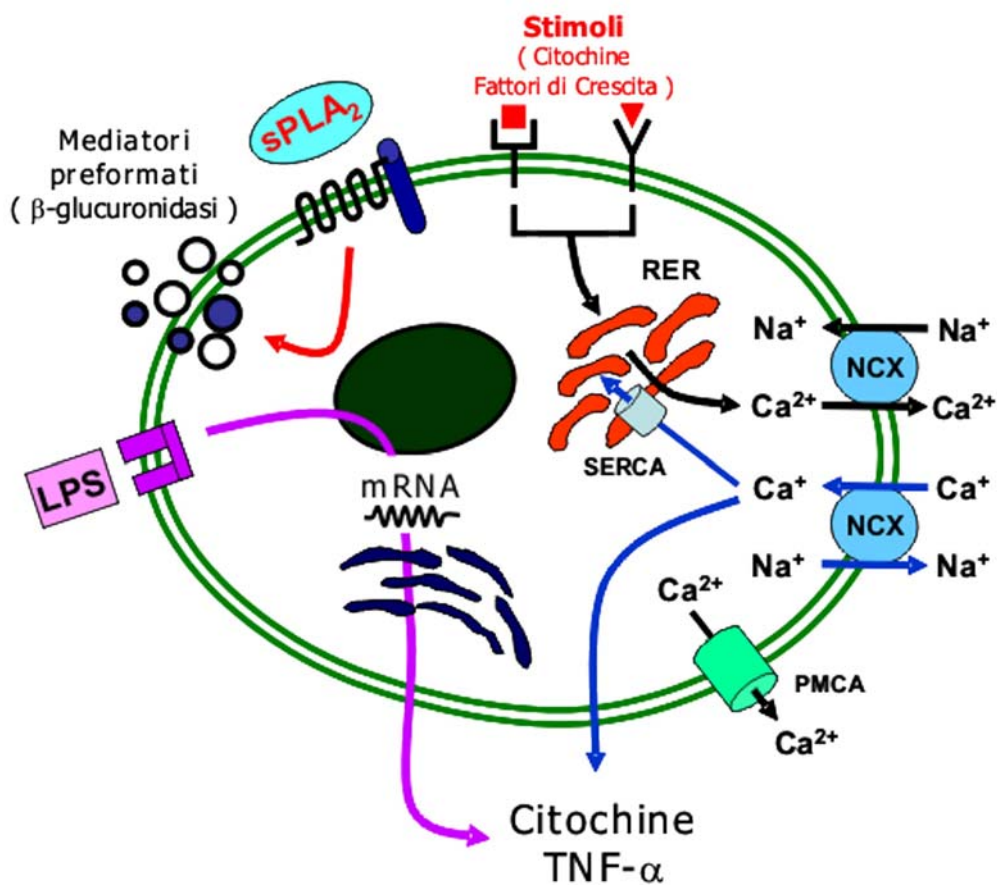


FIG. 14: Schema ipotetico del ruolo di NCX nei macrofagi e nei monociti umani. L'attivazione in modalità *reverse* di NCX induce l'incremento della $[Ca^{2+}]_i$. Il Ca^{2+} libero citoplasmatico da un lato determina la secrezione di citochine proinfiammatorie come il $TNF-\alpha$, dall'altro viene ricaptato nel reticolo endoplasmico (RER) ad opera della Ca^{2+} ATPasi del RER (SERCA). Il pathway di NCX non partecipa ai meccanismi di trasduzione del segnale generato dal LPS e dalla sPLA₂. Inoltre, NCX non è coinvolto nella esocitosi di mediatori preformati. Infine, è ipotizzabile che NCX contribuisca al ripristino delle normali $[Ca^{2+}]_i$ funzionando in modalità *forward* qualora il segnale di Ca^{2+} venga attivato da altri stimoli quali citochine e fattori di crescita. In tal caso, NCX potrebbe collaborare con gli altri sistemi omeostatici della cellula come la SERCA e le Ca^{2+} -ATPasi di membrana (PMCA).