

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Facoltà di Medicina e Chirurgia



DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA CLINICA E MEDICINA SPERIMENTALE

XXI CICLO 2005-2008

**Coordinatore: Prof. Gianni Marone**

Tesi di Dottorato

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

RELATORE

**Ch.mo**

**Prof. Amato de Paulis**

CANDIDATO

**Dott.ssa**

**Bianca Liccardo**

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

# INTRODUZIONE

---

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Recentemente, sono state proposte ulteriori funzioni di questi recettori in quanto FPRL1 ed FPRL2 sono in grado di interagire con una molteplicità di ligandi associati a differenti malattie, incluse l'amiloidosi, l'Alzheimer, la malattia prionica (21) ed HIV-1 (2,22). FPRL1 ha una bassa affinità per il tripeptide formilato ed è considerato un recettore promiscuo, essendo in grado di riconoscere diversi peptidi sintetici (WKYVM), peptidi naturali (la lipossina A<sub>4</sub>, la proteina amiloide sierica, il frammento di 42 aminoacidi della proteina  $\beta$ -amiloide, il peptide prionico PrP<sub>106-126</sub>, il sistema dell'urochinasi), peptidi di origine batterica [Hp(2-20) dell'*Helicobacter pylori*] e peptidi di derivazione virale (gp41 dell'HIV-1) (2,21,22). FPRL2, che non lega fMLP, è stimolato dall'urochinasi, da peptidi sintetici e da Hp(2-20) dell'*H. pylori* (Fig. 1) (23,24,25).



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

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

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

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

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

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

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

# MATERIALI E METODI

---

## *Reagenti*

Sono stati acquistati i seguenti reagenti: di-isopropil fluorofosfato (DFP; Fluka, Buchs, Switzerland); 60% HClO<sub>4</sub> (Baker Chemical Co., Deventer, Olanda); albumina sierica umana (HSA), PIPES buffer ed inibitori delle proteasi (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); HBSS, FCS, TRIzol e SuperScript II trascrittasi del virus della leucemia murina di Moloney (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY); FMLP (Calbiochem, La Jolla, CA); RPMI 1640 con 25 mM HEPES (Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD); *Eagle's minimum essential medium* (Flow Laboratories, Irvine, U.K.); Dextran 70 e Percoll (Pharmacia Biotech, Uppsala, Svezia); anticorpo policlonale di coniglio anti-uPAR 399 (American Diagnostica, Greenwich, CT); anticorpi anti-IgE PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA); IgG anti-coniglio HRP-coniugato e saggio colorimetrico per proteine (Bio-Rad, Richmond, CA); anticorpi anti-IgE PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA); anticorpi IgG anti-coniglio FITC (Abcam, Cambridge, UK); kit per ECL (Amersham Biosciences, Little Chalfont, U.K.); filtri di fluoruro di polivinilidene (Millipore, Bedford, MA); kit per PCR (PerkinElmer, Branchburg, NJ); filtri per chemiotassi (NeuroProbe, Cabin John, MD). L'esapeptide WKYVMV è stato

sintetizzato da Innovagen (Lund, Svezia); il peptide uPAR<sub>84-95</sub> (AVTYSRSRYLEC) e il suo peptide “scrambled” (TLVEYYSRASCR) sono stati sintetizzati da PRIMM (Milano, Italia). La ciclosporina H (CsH) è stata donata dal Dr. D. Romer e dal Dr. E. Rissi (Novartis, Basilea, Svizzera).

### ***Tamponi***

Il tampone utilizzato in questi esperimenti è composto da PIPES 25 mM, pH 7,4, NaCl 110 mM, KCl 5 mM. Esso è designato dalla lettera “P”. Il tampone PCG contiene, oltre a P, CaCl<sub>2</sub> 5 mM e 1 g/L di D-glucosio (32). Il tampone PACGM contiene, oltre a P, albumina sierica umana al 3%, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, 1 g/L di destrosio e 0,25 g/L di MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, pH 7,4; il PGMD contiene, oltre a P, 0,25 g/L di MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10 mg/L di DNase, e 1 g/L di gelatina, pH 7,4. Il PBS contiene 8 g/L di NaCl, 1,15 g/L di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200 mg/L di KCl, e 200 mg/L di KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4.

### ***Purificazione dei basofili umani dal sangue periferico***

I basofili sono stati purificati dal sangue periferico di donatori sani, negativi per gli anticorpi anti-HIV-1 e anti-HIV-2 (di età compresa tra i 20 ed i 39 anni: età media pari a 33,6 ± 4,9 anni), afferenti al Servizio di Immunoematologia dell’Università di Napoli Federico II. I leucociti sono stati

risospesi in PBS contenente 0,5 g/L di albumina sierica umana (HSA) e 3,42 g/L di sodio citrato, e quindi purificati usando un elutriatore controcorrente (Beckman, Fullerton, CA). Le frazioni contenenti più di  $20 \times 10^6$  basofili e con una buona purezza ( $>15\%$ ) sono state purificate usando un gradiente discontinuo Percoll. I basofili sono stati infine isolati, con un'omogeneità  $>98\%$ , eliminando linfociti B, monociti, cellule NK, cellule dendritiche, eritrociti, piastrine, neutrofilo, eosinofili e linfociti T mediante un cocktail di anticorpi anti-HLA-DR e apteni coniugati CD3, CD7, CD14, CD15, CD16, CD36, CD45RA e MACS MicroBeads coniugate con anticorpi antiapteni. Le cellule magneticamente marcate sono state eliminate attraverso ritenzione in una colonna su supporto magnetico della MidiMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germania). Con tale metodica si ottiene un numero di basofili variabile tra  $3$  e  $10 \times 10^6$  con una purezza in genere  $>99\%$ , come attestato dalla colorazione dei basofili con Alcian blue e dal conteggio nella camera di conta per eosinofili di Spiers-Levy (33).

### ***Culture cellulari***

La linea cellulare monocitaria umana THP-1 è stata mantenuta in coltura in sospensione in terreno RPMI 1640 con l'aggiunta di 10% di FCS. (34).

### ***RT-PCR e PCR quantitativa***

L'RNA cellulare totale dei granulociti basofili umani purificati è stato isolato mediante lisi in TRIzol, secondo il protocollo fornito dal produttore. L'RNA è stato fatto precipitare ed è stato quantificato tramite spettroscopia. 5 µg di RNA totale sono stati retrotrascritti a cDNA ed amplificati utilizzando specifici primers. Una PCR semiquantitativa è stata effettuata in un termocycler per 40 cicli: a 57°C per FPR e FPRL1, 64°C per FPRL2. L'espressione di tali recettori è stata, poi, confrontata con quella della β-actina, usata come controllo. I prodotti della reazione sono stati analizzati mediante elettroforesi in un gel di agarosio all'1%, contenente bromuro di etidio. La rilevazione è stata eseguita sotto illuminescenza UV (35).

### ***Chemiotassi***

La chemiotassi dei basofili è stata effettuata utilizzando la tecnica della camera di Boyden (26). In sintesi, 25 µl di tampone (PACGM) o di concentrazioni variabili degli stimoli da testare, sono stati posti in triplicato nel compartimento inferiore di una camera per micro-chemiotassi costituita da 48 pozzetti (Neuroprobe, Cabin John, MD). Il compartimento inferiore è stato ricoperto da una membrana in policarbonato con pori di 5 µm (Nucleopore

Corp., Pleasanton, CA). Successivamente 50  $\mu$ l ( $5 \times 10^4$  cellule/pozzetto) della sospensione in PAGCM sono stati aggiunti in ogni pozzetto del compartimento superiore. La camera per la chemiotassi è stata posta per 1 ora a 37°C, in un incubatore umidificato con CO<sub>2</sub> al 5% (Automatic CO<sub>2</sub> Incubator, Model 160 IR, ICN Flow). Al termine dell'incubazione la membrana di policarbonato è stata rimossa, lavata con PAGCM nella parte superiore, fissata e colorata con May-Grunwald/Giemsa. La chemiotassi è stata valutata mediante la conta al microscopio del numero di cellule che sono rimaste adese alla membrana con pori da 5  $\mu$ m. Per ogni esperimento sono stati contati 10 campi per ciascuno dei pozzetti in triplicato ad un ingrandimento di 40x. L'analisi di controllo è stata eseguita per discriminare la migrazione spontanea (chemiochinesi) dalla chemiotassi indotta dagli stimoli. I basofili sono stati posti nei pozzetti del compartimento superiore della camera mentre concentrazioni ottimali degli stimoli o del tampone PAGCM sono state aggiunte nel compartimento superiore, inferiore o in entrambi. La chemiochinesi è stata definita in assenza di stimoli chemiotattici o quando questi erano presenti sia nel compartimento superiore che in quello inferiore della camera di Boyden. Da questi esperimenti è risultato che i basofili migrano in risposta agli stimoli prevalentemente per chemiotassi e non per chemiochinesi (29).

### ***Dosaggio della lattico deidrogenasi***

Il rilascio di lattico deidrogenasi (LDH) al termine dell'incubazione è un indice di tossicità. LDH è stata misurata nei soprannatanti delle cellule usando un kit commercialmente disponibile (Sigma-Aldrich) (29).

### ***Analisi statistica***

Il risultati corrispondono alla media  $\pm$  SEM. I valori dei gruppi sono stati sottoposti a test di Student. La significatività è stata definita come  $p < 0.01$  (36).



# RISULTATI

---

## *FPR, FPRL1 ed FPRL2 nei basofili umani*

In una prima serie di esperienze abbiamo analizzato, mediante RT-PCR, la presenza di mRNA per FPR, FPRL1 ed FPRL2 nei basofili umani, isolati dal sangue periferico di donatori sani. La Figura 2 mostra i risultati dei nostri esperimenti in cui l'espressione degli FPRs nei basofili è confrontata con quella nelle cellule THP-1, utilizzate come controllo positivo (31). Questi risultati indicano che l'mRNA per le tre varianti recettoriali di FPRs è presente nei basofili umani.

## *I basofili ed il virus dell'HIV-1*

Il retrovirus HIV-1 presenta sulla sua superficie delle glicoproteine che permettono la fusione dell'envelope virale con le membrane delle cellule bersaglio e, di conseguenza, l'invasione e la diffusione del virus (37). Le due principali glicoproteine di HIV-1 sono gp120 e gp41. Il nostro laboratorio ha dimostrato che i basofili svolgono un ruolo significativo nella infezione da HIV-1 (38-41). In particolare, l'interazione della gp120 con IgE V<sub>H</sub>3<sup>+</sup> induce la sintesi ed il rilascio di istamina, IL-4 ed IL-13, da parte dei basofili (42). Inoltre, la proteina Tat, responsabile dell'attivazione della trascrizione virale, è un

potente agente chemiotattico per i basofili stessi mediante l'interazione con il recettore CCR3 espresso su tali cellule (42,43). Il nostro gruppo ha rafforzato la centralità del ruolo dei basofili nel corso di tale infezione, dimostrando che le cellule FcεRI<sup>+</sup> possono riconoscere il virus non solo attraverso le IgE, ma anche attraverso il recettore FPRL1.

In una prima serie di cinque esperimenti abbiamo valutato gli effetti che vari peptidi di gp41 (2017, 2019, 2020, 2021, 2023, 2027, 2029, 2030, 2031 e 2035) ( $5 \times 10^{-7}$  M), in grado di ricoprire l'intera sequenza proteica, hanno sulla chemiotassi dei basofili umani, purificati (>98%) dal sangue di diversi individui sieronegativi per HIV-1 ed HIV-2. Tali risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dalla stimolazione con fMLP ( $5 \times 10^{-7}$  M). Evidenze sperimentali, rappresentate in Figura 3, hanno dimostrato che i peptidi 2019 e 2021 sono dei potenti agenti chemiotattici per i basofili e che il loro effetto è solo leggermente inferiore a quello prodotto da fMLP.

Al fine di valutare la possibile interazione tra i peptidi di gp41 ed i recettori FPRs, abbiamo condotto degli esperimenti di desensibilizzazione tra gp41 ed fMLP. La Figura 4 mostra che la preincubazione dei basofili con elevate concentrazioni di fMLP ( $10^{-4}$  M), che desensibilizzano FPR ed FPRL1, determinano una significativa riduzione della risposta chemiotattica (30). I nostri risultati confermano che i peptidi di gp41 sono in grado di indurre la chemiotassi dei basofili tramite l'interazione con FPRL1.

## *I basofili ed Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* è un batterio Gram-negativo, specializzato nella colonizzazione dello stomaco umano (44). La sua infezione è la maggiore causa di malattie a livello gastroduodenale (45,46) ed è correlata con il rischio di carcinoma gastrico (47).

Abbiamo utilizzato un anticorpo monoclonale (BB1) specifico diretto contro la basogranulina, che è una proteina selettivamente presente nei granuli dei basofili (28). La Figura 5 dimostra che le cellule positive con l'anticorpo BB1 infiltrano la mucosa gastrica in pazienti affetti da gastrite moderata o grave indotta da infezione da *H. pylori*.

Abbiamo inoltre dimostrato che un derivato dell'*H. pylori*, il composto Hp(2-20), un peptide amminoterminale derivato dalla proteina ribosomiale L1, simile alle cecropine (48), è un potente agente chemiotattico per i basofili a concentrazioni nanomolari, con un plateau di  $3 \times 10^{-7}$  M (Fig. 6) (28).

Mediante esperimenti di desensibilizzazione, abbiamo studiato quale membro della famiglia FPRs fosse implicato nella chemiotassi dei basofili. Questi esperimenti sono stati condotti in una camera di Boyden, preincubando i basofili (1h a 37°C) con CsH (800 nM), un antagonista selettivo di FPR (49), o con il peptide sintetico WKYVMm (500 nM), che lega tutti e tre i recettori, e stimolando successivamente la migrazione in risposta ad Hp(2-20) ( $3 \times 10^{-7}$  M).

la preincubazione con la CsH non ha alcuna influenza sulla chemiotassi delle cellule FcεRI<sup>+</sup>; viceversa, la preincubazione con il peptide WKYMVm diminuisce fortemente la risposta chemiotattica indotta da concentrazioni ottimali di Hp(2-20). Questi risultati consentono di prospettare che Hp(2-20) agisca mediante l'interazione con FPRL1 ed FPRL2 e non con FPR (28).

### *I basofili e l'urochinasi*

L'urochinasi (uPA) è una serin-proteasi di 50 kDa che catalizza la specifica conversione del plasminogeno in plasmina (31). Questo enzima è secreto come uno zimogeno inattivo (pro-uPA), che è proteoliticamente convertito nella forma attiva (uPA). Entrambe le forme dell'urochinasi (pro-uPA ed uPA) sono in grado di legarsi ad alta affinità ad uno specifico recettore di membrana, noto come uPAR (CD87), espresso sulla superficie di numerosi tipi cellulari (50-52). Tale recettore è costituito da tre domini: D1, che rappresenta la porzione amino-terminale ed il sito d'interazione con il ligando (uPA), D2 o regione linker che connette D1 a D3, e D3, la porzione carbossi-terminale, che ancora il recettore alla membrana cellulare grazie ad una coda glicofosfatidilinositolica (GPI) (53).

Numerosi enzimi proteolitici, tra cui uPA stesso, possono clivare il recettore uPAR in diverse regioni, generando varie forme di membrana e forme solubili. Il sistema uPA/uPAR non è coinvolto solo nella fibrinolisi, ma media

molti altri fenomeni quali l'adesione e la migrazione cellulare, il rimodellamento tissutale, l'apoptosi e l'invasione neoplastica (31).

L'analisi RT-PCR, ottenuta tramite elettroforesi su gel di agarosio, ha evidenziato, nei basofili, la presenza di mRNA per uPAR sia nella forma intera (D1D2D3) che clivata (c-uPAR, D2D3, 35kDa), ma non dell'mRNA per uPA (54). In una serie di esperimenti abbiamo valutato gli effetti *in vitro* di un largo spettro di concentrazioni ( $10^{-13}$  -  $10^{-9}$  M) di DFP-uPA, sulla chemiotassi di basofili umani purificati (>98%). DFP-uPA è una forma inattiva dell'urochinasi, in cui è stata bloccata l'azione enzimatica. È stato utilizzato questo tipo di ligando per valutare solo gli effetti dovuti al legame di uPA con il recettore, escludendo quelli correlati alla attività enzimatica della molecola.

Concentrazioni nanomolari di DFP-uPA sono in grado di indurre la chemiotassi dei basofili, con un plateau a  $10^{-10}$  M (Fig. 7). Tali risultati mostrano, quindi, che l'attività enzimatica di uPA non è responsabile della funzione chemiotattica dei basofili umani (31).

Alcune evidenze sperimentali indicano che uPAR può essere fisicamente e funzionalmente associato ai recettori per i peptidi formilati (FPRs) (55,56). Pertanto, in una serie successiva di esperimenti abbiamo valutato gli effetti di un peptide del recettore dell'urochinasi, uPAR<sub>84-95</sub>, sulla chemiotassi delle cellule FcεRI<sup>+</sup> ed il coinvolgimento dei recettori FPRs. È stato verificato che concentrazioni picomolari ( $10^{-3}$  -  $10^{-9}$  M) di uPAR<sub>84-95</sub> inducono la chemiotassi

dei basofili con un plateau a  $10^{-11}$  M. E' interessante osservare che analoghe concentrazioni ( $10^{-3}$  -  $10^{-9}$  M) del peptide di controllo non sono attive (Fig. 7).

Al fine di investigare quale membro della famiglia dei recettori per fMLP fosse responsabile della chemiotassi dei basofili dipendente da uPA e dal suo recettore, sono stati condotti esperimenti di desensibilizzazione mediante l'utilizzo di alte concentrazioni di fMLP e del peptide sintetico WKYMVm. È stato osservato che il recettore maggiormente implicato nella chemiotassi indotta da uPA e uPAR è FPRL2 (31). E' opportuno segnalare che sinora FPRL2 era considerato un recettore orfano. La dimostrazione che uPAR sia in grado di legare FPRL2 ha consentito di individuare un primo ligando endogeno di questa importante classe di recettori.

### ***I basofili e le proteine amiloidi***

Le proteine amiloidi rappresentano un altro gruppo di ligandi capaci di agire sui recettori FPRs (2,21); pertanto, le cellule che esprimono tali recettori potrebbero svolgere un ruolo significativo nella morte neuronale e nella gliosi, associate a disordini amiloidi e neurodegenerativi.

Il recettore avente maggiore affinità di legame per le proteine amiloidogeniche è FPRL1. Esso è in grado di legare la proteina amiloide sierica (SAA) e di indurre, così, la chemiotassi di leucociti fagocitari nei più disparati siti di flogosi acuta (57). Infatti, il reclutamento *in situ* e la conseguente

degradazione della proteina rappresenta una delle risposte più frequenti alla clearance di agenti patogeni, ma anche all'infiammazione ed alle lesioni tissutali associate all'amiloidosi.

L'osservazione che FPRL1 possa essere usato come recettore chemiotattico da SAA, che è una proteina della fase acuta di qualsiasi infiammazione, ha permesso di postulare, successivamente, l'utilizzo dello stesso da parte di altre proteine amiloidi (2).

Esperimenti effettuati con la camera di Boyden, hanno consentito di dimostrare che sia la proteina  $\beta$ -amiloide associata al morbo di Alzheimer ( $A\beta_{42}$ ,  $10^{-5} - 5 \times 10^{-5}$  M), che l'isoforma patogena del peptide prionico implicato nell'encefalopatia PRE ( $PrP_{106-126}$ ,  $10^{-6} - 10^{-5}$  M), sono importanti agonisti per la chemiotassi dei basofili umani (Fig. 8). Esperimenti di desensibilizzazione, illustrati in Figura 9, hanno dimostrato che la preincubazione delle cellule con basse concentrazioni di fMLP ( $10^{-7}$  M), che desensibilizzano FPR, non hanno alcun effetto sulla chemiotassi indotta dal peptide prionico ( $10^{-6}$  M). Viceversa, elevate concentrazioni di fMLP ( $10^{-4}$  M) ed il peptide sintetico WKYMVm ( $10^{-7}$  M), che desensibilizzano rispettivamente FPR/FPRL1 ed FPR/FPRL1/FPRL2, sono in grado di bloccare il processo chemiotattico. Questi risultati confermano l'ipotesi che il recettore implicato in tal contesto sia FPRL1.

## DISCUSSIONE

---

I recettori FPR, FPR-like1 ed FPR-like2 riconoscono come ligando primario fMLP che è un tripeptide formilato di origine batterica. Più di recente si è visto che il sistema degli FPRs è in grado di legare specificamente numerosi prodotti di origine endogena (uPA, uPAR, LXA<sub>4</sub>, etc.) ed esogena [gp41 di HIV-1, Hp(2-20) di *Helicobacter pylori*, PrP<sub>106-126</sub>, Aβ-amiloide, etc.]. Queste nuove osservazioni lasciano supporre che tale sistema recettoriale sia implicato nei meccanismi di immunità innata, svolgendo funzioni simili ai recettori scavenger.

Gli esperimenti descritti in questo lavoro hanno dimostrato che i basofili esprimono sulla loro superficie tutte e tre le forme recettoriali FPR, FPRL1 e FPRL2 (28). L'attivazione dei recettori FPRs, indotta da diversi agonisti (gp41 di HIV-1, Hp(2-20) di *Helicobacter pylori*, uPA, uPAR, proteina β-amiloide, peptide prionico), determina la chemiotassi di tali cellule.

Questi risultati suggeriscono che le cellule FcεRI<sup>+</sup> possano intervenire non solo nei disordini di natura allergica, ma anche in corso di infezioni batteriche, virali e malattie neurodegenerative, durante le quali, infiltrando i siti di flogosi, rivestirebbero un ruolo preminente, mediante la produzione di citochine e di mediatori pro-infiammatori.



Gli studi condotti nel corso degli ultimi anni dal nostro gruppo hanno portato all'identificazione di specifiche interazioni tra basofili e strutture batteriche e virali, come ad esempio quella esistente tra cellule FcεRI<sup>+</sup> ed il virus dell'HIV-1 (42). Infatti, è stato dimostrato che i basofili ed i loro mediatori possono essere implicati nella patogenesi della infezione da HIV-1. Abbiamo caratterizzato tre livelli di interazione tra il virus ed i basofili: la gp120 induce il rilascio di citochine e mediatori preformati, come IL-4, IL-13 ed istamina (40,42); la proteina Tat è in grado di indurre la loro chemiotassi, attraverso l'interazione con il recettore CCR3, e di up-regolare l'espressione di quest'ultimo (41); mentre i peptidi 2019 e 2021 di gp41 inducono la chemiotassi e la secrezione di mediatori da parte dei basofili, attraverso l'interazione con FPRL1 (30).

Questi risultati contribuiscono nell'insieme ad evidenziare la complessità dell'interazione tra le proteine di HIV-1 ed i basofili e, quindi, a sostenere l'ipotesi che queste cellule siano implicate nella disregolazione del sistema immune, che si osserva nel corso di tali infezioni.

Una seconda serie di esperienze ha permesso di approfondire il ruolo dei basofili durante un'infezione batterica, quale quella da *Helicobacter pylori* (28), che risiede nello strato di muco presente al di sopra dell'epitelio gastrico. Si ritiene che il batterio sia in grado di produrre una serie di proteine che diffondono attraverso lo strato di muco e determinano la chemiotassi di

monociti, di macrofagi, di neutrofili e di linfociti. Sono stati identificati diversi prodotti chemiotattici rilasciati dal batterio: VacA, Cag A e HP-NAP (28).

Più di recente, evidenze sperimentali hanno mostrato che il peptide Hp(2-20), prodotto da *H. pylori*, è un forte agente chemiotattico per i monociti umani (25) e, successivamente, il nostro gruppo ha dimostrato che tale peptide esplica un potente effetto chemiotattico *in vitro* anche sui basofili umani, attraverso l'interazione con FPRL1 e FPRL2 (28).

Inoltre, in una serie di studi condotti su campioni di mucosa gastrica, ottenuta da pazienti affetti da gastrite cronica di grado moderato/severo indotta da *H. pylori*, abbiamo verificato la presenza di un infiltrato basofilo nella mucosa.

L'urochinasi (uPA) è l'attivatore del plasminogeno e mostra un'alta affinità per il recettore (uPAR) (31). Il sistema uPA-uPAR è cruciale per la fibrinolisi, per l'adesione e la migrazione cellulare, per la riparazione del tessuto (52,58). Partendo da tali evidenze, abbiamo investigato l'espressione e la funzione del sistema uPA-uPAR nei basofili, dimostrando che questi presentano uPAR sia nella forma intatta che clivata. Abbiamo verificato che uPA ed uPAR<sub>84-95</sub> sono potenti fattori chemiotattici per queste cellule. uPAR non ha domini transmembrana e pertanto deve mediare le proprie azioni attraverso il legame con molecole di superficie in grado di interagire con sistemi intracellulari. I nostri risultati sono compatibili con l'ipotesi che la chemiotassi dei basofili dipendente da uPA sia legata all'esposizione di un dominio chemiotattico del recettore per l'urochinasi, che rappresenterebbe un ligando

endogeno per il recettore FPRL2, espresso sui basofili stessi (31). Appare pertanto ipotizzabile l'utilizzo di fattori in grado di inibire la chemiotassi indotta da uPAR (ad esempio fattori che bloccano l'epitopo chemiotattico) per inibire la risposta sostenuta dai basofili nelle reazioni infiammatorie.

Un'ultima serie di esperimenti ha portato all'identificazione di FPRL1 come recettore funzionale sui basofili per la proteina  $\beta$ -amiloide ed il peptide prionico PrP<sub>106-126</sub>. Questi risultati supportano l'ipotesi che FPRL1 sia implicato nella risposta pro-infiammatoria, che si osserva durante il morbo di Alzheimer e l'encefalopatia di natura prionica (PRE). È stato dimostrato, infatti, che tale recettore favorisce direttamente la migrazione e l'accumulo dei fagociti nei siti specifici e che la risposta infiammatoria può essere distruttiva per le cellule neuronali. L'infiltrato infiammatorio contribuirebbe, quindi, alla degenerazione ed alla morte neuronale, che si osservano nel corso di queste patologie neurodegenerative.

L'insieme dei dati illustrati contribuiscono a chiarire alcuni meccanismi patogenetici in cui i recettori FPRs svolgono un ruolo predominante. Ulteriori ricerche appaiono necessarie al fine di precisare la loro azione fisiopatologia.

In conclusione i nostri risultati hanno contribuito ad ampliare il ruolo dei basofili durante le risposte immunitarie, estendendo le loro funzioni a condizioni patologiche di varia natura, diverse dalla classica flogosi allergica.

## BIBLIOGRAFIA

---

1. Migeotte I., Communi D., Parmentier M. 2006. Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune response. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17:501-19.
2. Le Y., Oppenheim J.J., Wang J.M. 2001. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine and Growth Factor Rev.* 12:91-105.
3. Le Y., Murphy P.M., Wang J.M. 2002. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol.* 23:541-48.
4. Zhou Y., Bian X., Le Y., Gong W., Hu J., Zhang X., Wang L., Iribarren P., Salcedo R., Howard O.M., Farra W., Wang J.M. 2005. Formyl peptide receptor FPR and the rapid growth of malignant human gliomas. *J. National Cancer Institute.* 11:823-835.
5. Wang J.M., Deng X., Gong W., Su S. 1998. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J. Immunol. Methods* 220:1-17.
6. Muller A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M.E. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 410:50-6.
7. Wang J.M., Chertov O., Proost P., Li J.J., Mentan P., Xu L. 1998. Purification and identification of chemokines potentially involved in

- kidney-specific metastasis by murine lymphoma variant: induction of migration and NFkB activation. *Int. J. Cancer*. 75:900-7.
8. Durstin M., Gao J.L., Tiffany H.L., McDermott D., Murphy P.M. 1994. Differential expression of members of the *N*-formyl peptide receptor gene cluster in human phagocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:174-9.
  9. Czapiga M., Gao J.L., Kirk A., Lekstrom-Himes J. 2005. Human platelets exhibit chemotaxis using functional *N*-formyl peptide receptors. *Exp. Hematol.* 33:73-84.
  10. Becker E.L., Forouhar F.A., Grunnet M.L., Boulay F., Tardif M., Bormann B.J. 1998. Broad immunocytochemical localization of the formyl peptide receptor in human organs, tissues, and cells. *Cell. Tissue Res.* 292:129-35.
  11. Harada M., Habata Y., Hosoya M., Nishi K., Fujii R., Kobayashi M. 2004. *N*-formylated humanin activates both formyl peptide receptor-Like 1 and 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324:255-61.
  12. Yang D., Chen Q., Gertz B., He R., Phulsuksombati M., Ye R.D. 2002. Human dendritic cells express functional formyl peptide receptor-Like 2 (FPRL-2) throughout maturation. *J. Leukoc. Biol.* 72:598-607.
  13. Yang D., Chen Q., Le Y.Y., Wang J.M., Oppenheim J.J. 2001. Differential regulation of formyl peptide receptor-Like 1 expression

- during the differentiation of monocytes to dendritic cells and macrophages. *J. Immunol.* 166:4092-8.
14. Cavicchioni G., Fraulini A., Turchetti M., Varani K., Falzarano S., Pavan B., Spisani S. 2005. Biological activity of  $\alpha$ -Met-Leu-Phe-OMe analogs: relevant substitutions specifically trigger killing mechanisms in human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 512:1-8.
  15. Hirsch E., Katanaev V.L., Garlanda C., Azzolino O., Pirola L., Silengo L. 2000. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science.* 287:1049-53.
  16. Wenzel-Seifert K., Hurt C.M., Seifert R. 1998. High constitutive activity of the human formyl peptide receptor. *J. Biol. Chem.* 273:24181-89.
  17. Ali H., Richardson R.M., Haribabu B., Snyderman R. 1999. Chemoattractant receptor cross-desensitization. *J. Biol. Chem.* 274:6027-30.
  18. Deng X., Ueda H., Su S.B., Gong W., Dunlop N.M., Gao J.L. 1999. A synthetic peptide derived from HIV-1 gp 120 down-regulates the expression and function of chemokine receptors CCR5 and CXCR4 in monocytes by activating the seven-transmembrane G protein-coupled receptor FPRL1/LXA4R. *Blood.* 94:1165-73.
  19. Gao J.L., Chen H., Filie J.D., Kozak C.A., Murphy P.M. 1998. Differential expansion of the *N*-formyl peptide receptor gene cluster in human and mouse. *Genomics.* 51:270-6.

20. Alvarez V., Coto E., Setien F., Gonzalez-Roces S., Lopez-Larrea C. 1996. Molecular evolution of the *N*-formyl peptide and C5a receptors in non-human primates. *Immunogenetics*. 44:446-52.
21. Forman M.S., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. 2004. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat. Med.* 10:1055-63.
22. Su S.B., Gong W.H., Gao J.L., Shen W.P., Grimm M.C., Deng X.Y. 1999. T20/DP178, an ectodomain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41, is an activator of human phagocyte *N*-formyl peptide receptor. *Blood*. 93:3885-92.
23. Christophe T., Karlsson A., Dugave C., Rabiet M.J., Boulay F., Dahlgren C. 2001. The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH<sub>2</sub> specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A<sub>4</sub> receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *J. Biol. Chem.* 276:21585-93.
24. Gao J.L., Murphy P.M. 1993. Species and subtype variants of the *N*-formyl peptide chemotactic receptor reveal multiple important functional domains. *J. Biol. Chem.* 268:25395-401.
25. Betten Å., Bylund J., Cristophe T., Boulay F., Romero A., Hellstrand K., Dahlgren C. 2001. A proinflammatory peptide from *Helicobacter pylori* activates monocytes to induce lymphocytes dysfunction and apoptosis. *J. Clin. Invest.* 108:1221-8.

26. Marone G. 1995. Human basophils and mast cells: biological aspects. Basel: Karger.
27. Marone G. 1995. Human basophils and mast cells: clinical aspects. Basel: Karger.
28. de Paulis A., Prevete N., Fiorentino I., Walls A.F., Curto M., Petraroli A., Castaldo V., Ceppa P., Fiocca R., Marone G. 2004. Basophils infiltrate human gastric mucosa at sites of *Helicobacter pylori* infection, and exhibit chemotaxis in response to *H. pylori*-derived peptide Hp(2–20). *J. Immunol.* 172:7734-43.
29. de Paulis A., Prevete N., Fiorentino I., Rossi F.W., Staibano S., Montuori N., Ragno P., Longobardi A., Liccardo B., Genovese A., Ribatti D., Walls A.F., Marone G. 2006. Expression and functions of the vascular endothelial growth factors and their receptors in human basophils. *J. Immunol.* 177:7322-31.
30. de Paulis A., Florio G., Prevete N., Triggiani M., Fiorentino I., Genovese A., Marone G. 2002. HIV-1 envelope gp41 peptides promote migration of human FcεRI<sup>+</sup> cells and inhibit IL-13 synthesis through interaction with formyl peptide receptors. *J. Immunol.* 169:4559-67.
31. de Paulis A., Montuori N., Prevete N., Fiorentino I., Rossi F.W., Visconte V., Rossi G., Marone G., Ragno P. 2004. Urokinase induces basophil chemotaxis through a urokinase receptor epitope that is an endogenous

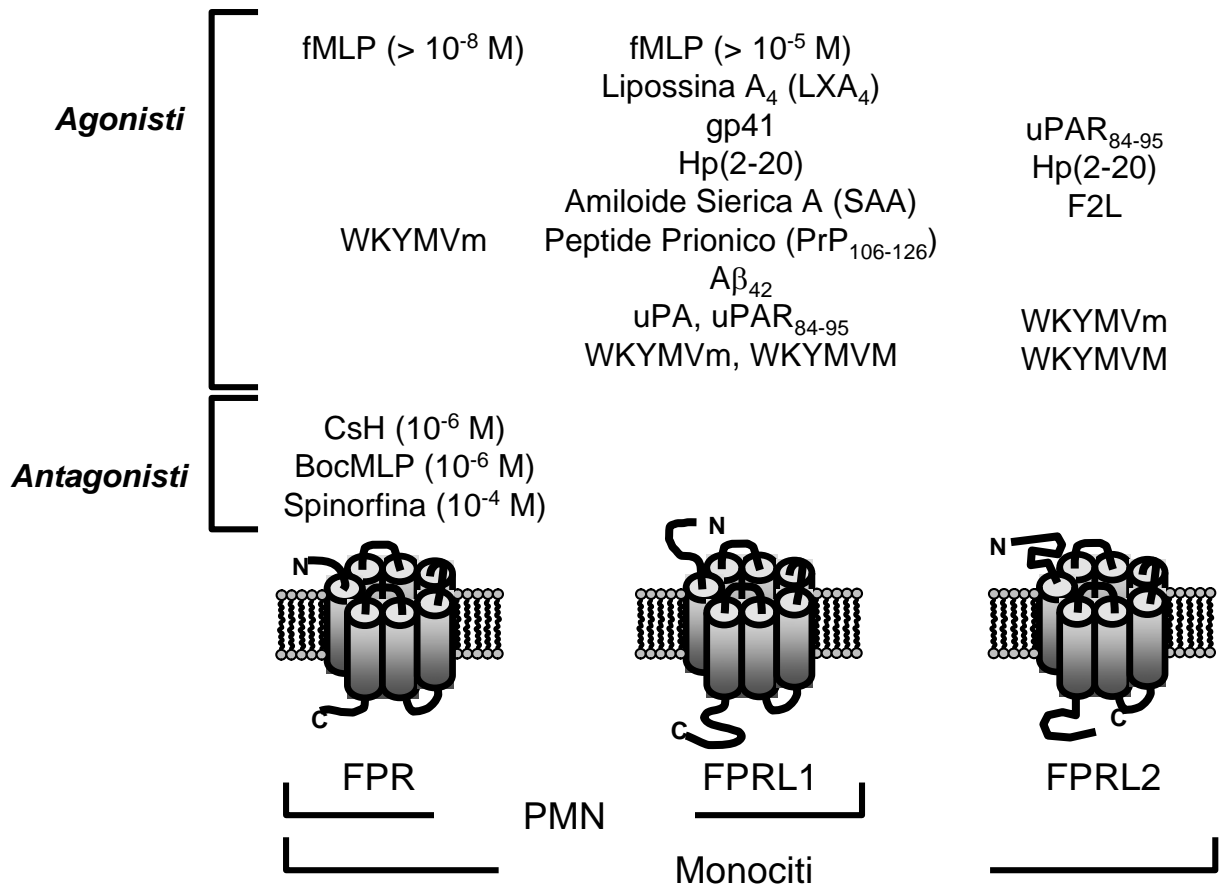


- ligand for formyl peptide receptor-like 1 and like-2". *J. Immunol.* 173:5739-48.
32. de Paulis A., Cirillo R., Ciccarelli A., Condorelli M., Marone G. 1991. FK-506, a potent novel inhibitor of the release of proinflammatory mediators from human FcεRI<sup>+</sup> cells. *J. Immunol.* 1991. 146:2374-81.
33. Romagnani P., de Paulis A., Beltrame C., Annunziato F., Dente V., Maggi E., Romagnani S., Marone G. 1999. Tryptase-chymase double-positive human mast cells express the eotaxin receptor CCR3 and are attracted by CCR3-binding chemokines. *Am. J. Pathol.* 155:1195.
34. Ragno P., Montuori N., Vassalli J.D., Rossi G. 1993. Processing of complex between urokinase and its type-2 inhibitor on the cell surface: a possible regulatory mechanism of urokinase activity. *FEBS Lett.* 323:279-84.
35. Montuori N., Carriero M.V., Salzano S., Rossi G., Ragno P. 2002. The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. *J. Biol. Chem.* 277:46932-9.
36. Snedecor G.W., Cochran W.G. 1980. *Statistical Methods*. Iowa State University Press, Ames.
37. Lawess M.K., Barney S., Guthrie K.I., Bucy T.B., Petteway S.R., Merutka G. 1996. Hiv-1 membrane fusion mechanism: structural studies of the interactions between biologically-active peptides from gp41. *Biochemistry.* 35:13697-708.

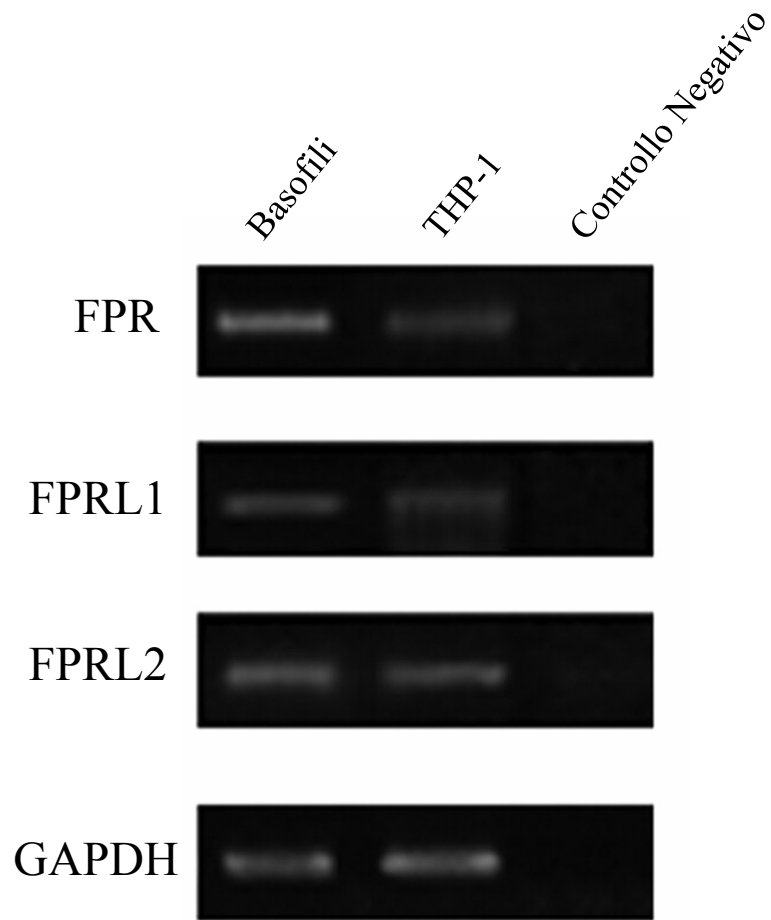
38. Marone G., Florio G., Triggiani M., Petraroli A., de Paulis A. 2000. Mechanism of IgE elevation in HIV-1 infection. *Crit. Rev. Immunol.* 20:477-96.
39. Marone G., Florio G., Petraroli A., de Paulis A. 2001. Dysregulation of the IgE/FcεRI network in HIV-1 infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107:22-30.
40. Marone G., Florio G., Petraroli A., Triggiani M., de Paulis A. 2001. Role of human FcεRI<sup>+</sup> cells in HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* 179:128-38.
41. Marone G., Florio G., Petraroli A., Triggiani M., de Paulis A. 2001. Human mast cells and basophils in HIV-1 infection. *Trends Immunol.* 22:229-32.
42. Patella V., Florio G., Petraroli A., Marone G. 2000. HIV-1 gp120 induces IL-4 and IL-13 release from human FcεRI<sup>+</sup> cells through interaction with the V<sub>H</sub>3 region of IgE. *J. Immunol.* 164:589-95.
43. de Paulis A., De Palma R., Di Gioia L., Canfora M., Prevete N., Tosi G., Accolla R.S., Marone G. 2000. Tat protein is an HIV-1 encoded β-chemokine homolog that promotes migration and up-regulates CCR3 expression on human FcεRI<sup>+</sup> cells. *J. Immunol.* 165:7171-9.
44. Blaser M.J., Parsonnet J. 1994. Parasitism by the “slow” bacterium *Helicobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *J. Clin. Invest.* 94:4-8.

45. Montecucco C., Rappuoli R. 2001. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:457-66.
46. Suerbaum S., Michetti P. 2002. *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* 347:1175-86.
47. Nomura A., Stemmerman G.N., Chyou P.H., Kato I., Perez-Perez G.I., Blaser M.J. 1991. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N. Engl. J. Med.* 325:1132-6.
48. Pütsep K., Branden C.I., Boman H.G., Normark S. 1999. Antibacterial peptide from *H. Pylori*. *Nature.* 398:671-2.
49. de Paulis A., Ciccarelli A., de Crescenzo G., Cirillo R., Patella V., Marone G. 1996. Cyclosporin H is a potent and selective competitive antagonist of human basophil activation by *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98:152-64.
50. Irigoyen J.P., Muñoz-Cánoves P., Montero L., Koziczak M., Nagamine Y. 1999. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 56:104-32.
51. Preissner K.T., Kanse S.M., May A.E. 2000. Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication". *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:621-8.
52. Blasi F., Carmeliet P. 2002. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:932-43.

53. Danø K., Behrendt N., Brønner N., Ellis V., Ploug M., Pyke C. 1994. The urokinase-receptor: protein structure and role in plasminogen activation and cancer invasion. *Fibrinolysis*. 8:189-92.
54. Høyer-Hansen G., Rønne E., Solberg H., Behrendt N., Ploug M., Lund L.R., Ellis V., Danø K. 1992. Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. *J. Biol. Chem.* 267:18224-9.
55. Resnati M., Pallavicini I., Wang J.M., Oppenheim J., Serhan C.N., Romano M., Blasi F. 2002. The fibrinolytic receptor for urokinase activates the G protein-coupled chemotactic receptor FPRL1/IXA4R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:1359-64.
56. Montuori N., Carriero M.V., Salzano S., Rossi G., Ragno P. 2002. The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. *J. Biol. Chem.* 277:46932-9.
57. Su S.B., Gong W.H., Gao J.L., Shen W.P., Murphy P.M., Oppenheim J.J., Wang J.M. 1999. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J. Exp. Med.* 189:395-402.
58. Ossowski L., Aguirre-Ghiso J.A. 2000. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:613-20.

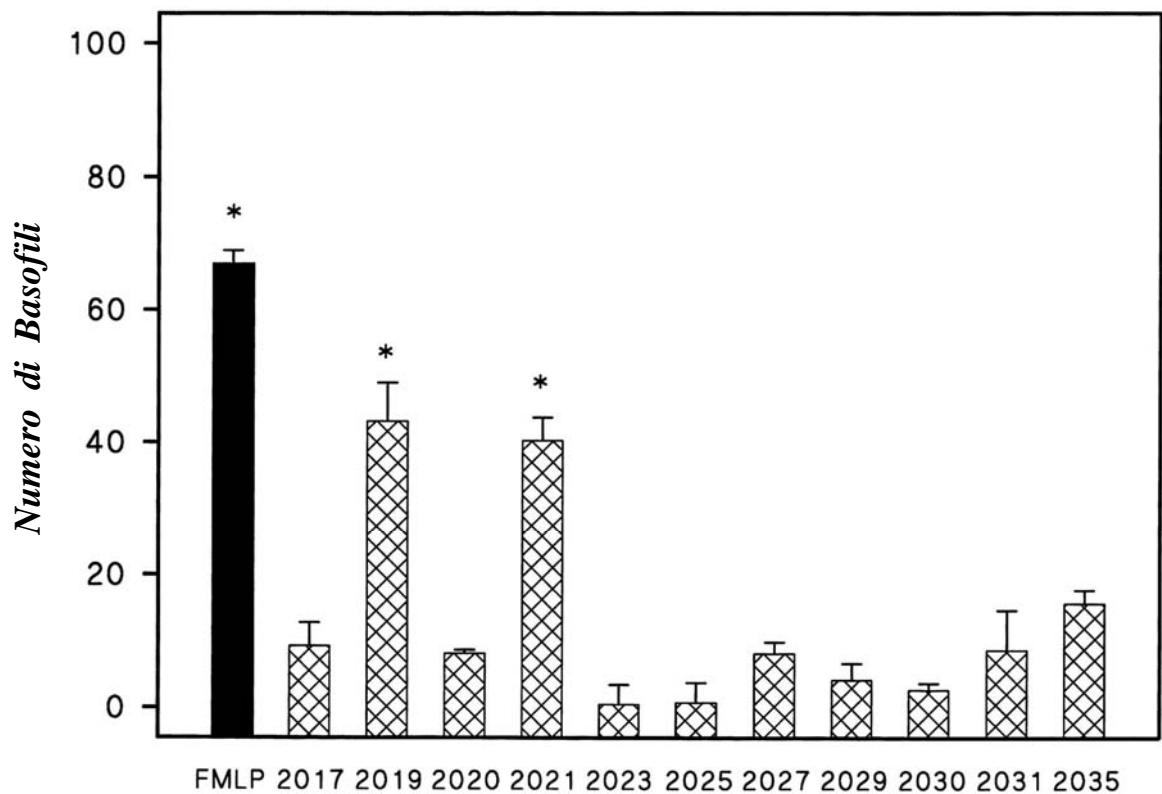


**Figura 1 - Agonisti ed antagonisti dei recettori FPR, FPRL1 e FPRL2.**



**Figura 2 - RT-PCR osservata tramite elettroforesi su gel di agarosio.**

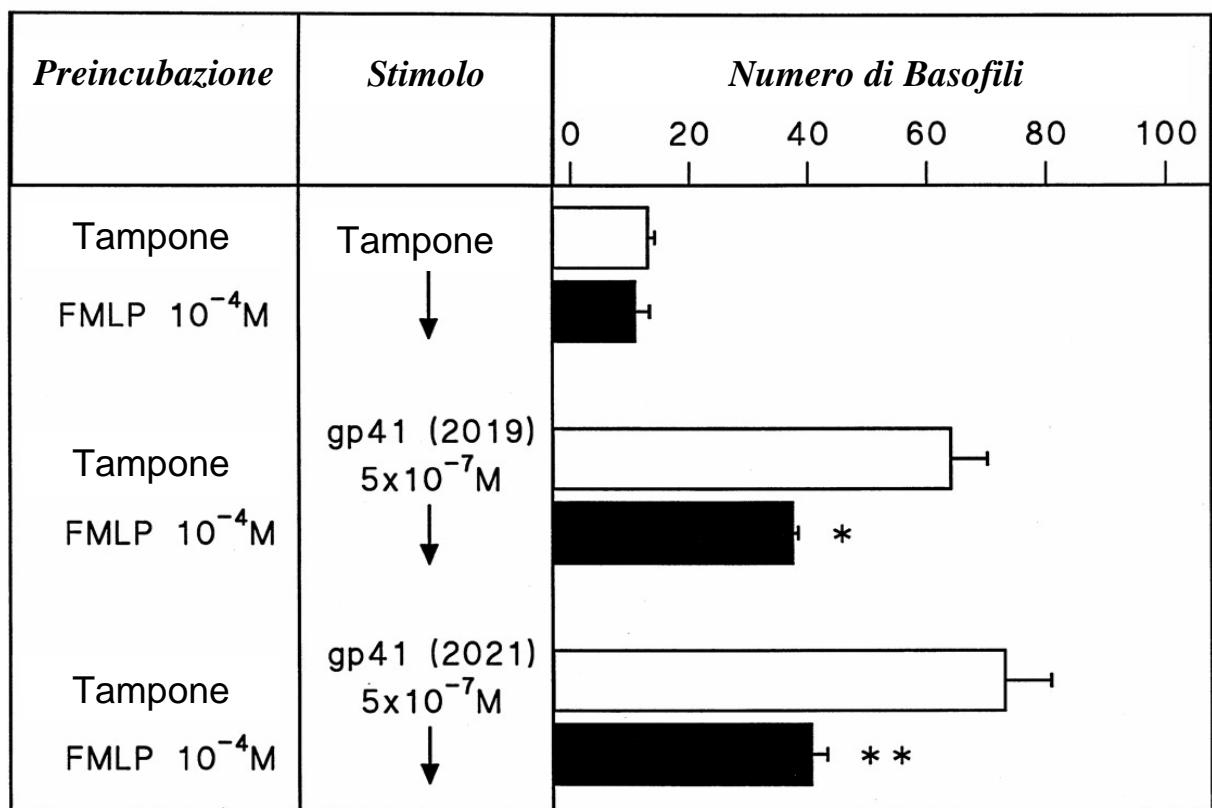
mRNA di FPR, FPRL1 e FPRL2 è espresso nei basofili umani purificati da sangue periferico; la linea cellulare monocitaria THP-1 è stata utilizzata come controllo positivo.



**Figura 3 - Effetto dei peptidi di gp41 ( $5 \times 10^{-7}$  M) e di fMLP ( $5 \times 10^{-7}$  M) sulla chemiotassi dei basofili umani.**

I basofili sono stati ottenuti dal sangue periferico di donatori negativi per il virus di HIV-1 ed HIV-2. I risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dalla stimolazione con fMLP ( $5 \times 10^{-7}$  M) e rappresentano la media  $\pm$  ESM di cinque esperimenti. Solo i peptidi 2019 e 2021 causano la chemiotassi dei basofili.

\*  $p < 0.01$  confrontati con basofili non stimolati.



**Figura 4 - Desensibilizzazione eterologa tra peptidi di gp41 ed fMLP.**

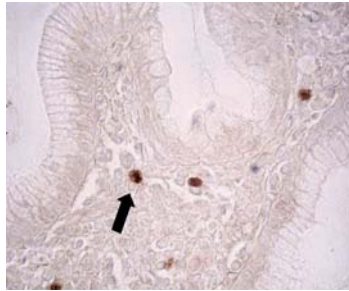
I basofili sono stati preincubati in tampono contenente EDTA (4 mM) o fMLP ( $10^{-4}$  M) per 30 minuti a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate e risospese in PACGM e indotte a migrare verso i peptidi 2019 e 2021 di gp41 ( $5 \times 10^{-7}$  M). La risposta chemiotattica a tali stimoli è risultata significativamente desensibilizzata dalla preincubazione con fMLP. I risultati ottenuti rappresentano la media  $\pm$  ESM di tre esperimenti.

\*  $p < 0.01$  confrontati con basofili stimolati con gp41 (2019).

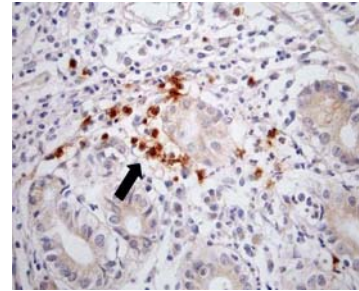
\*\*  $p < 0.01$  confrontati con basofili stimolati con gp41 (2021).



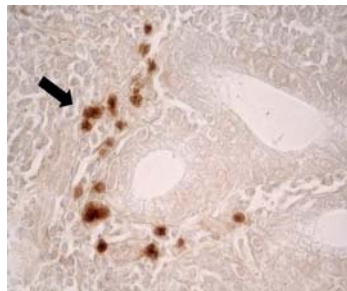
**Basofili BB1-immunoreattivi  
localizzati in prossimità dell'epitelio  
gastrico**



**Gruppo di Basofili  
intorno all'epitelio foveolare**

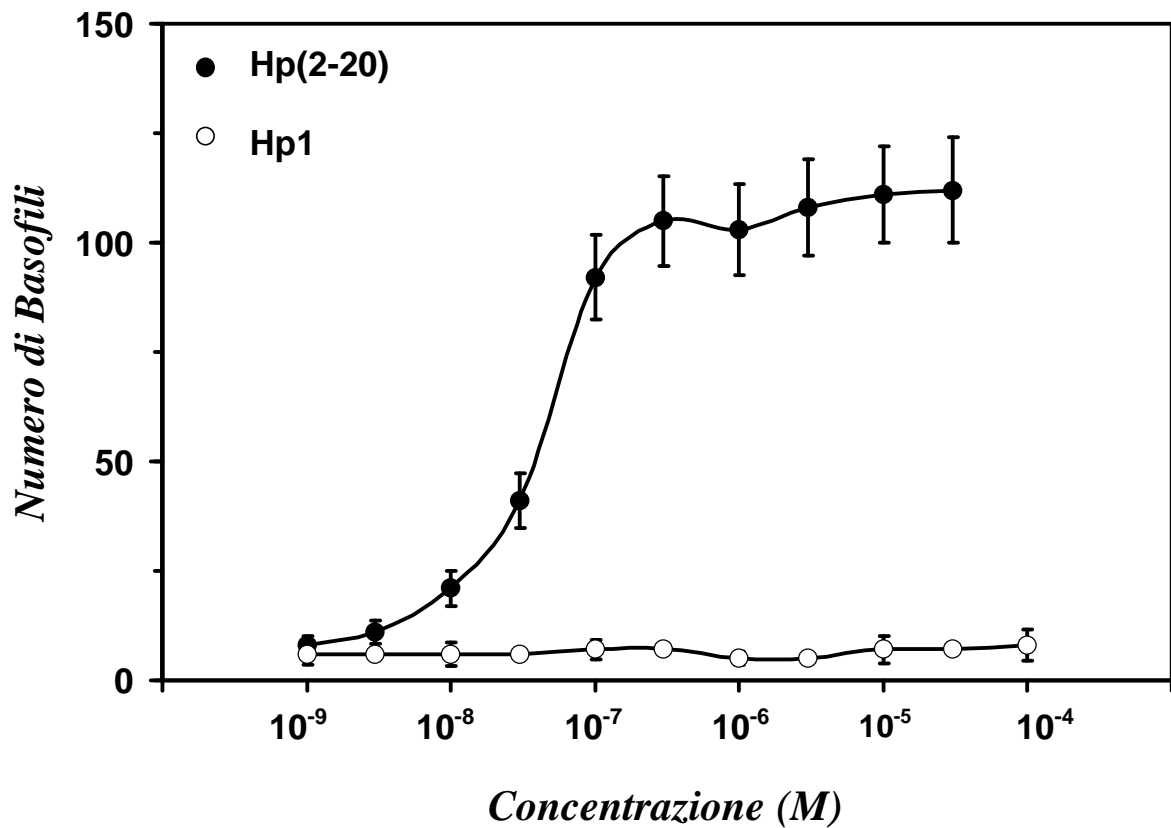


**Gruppo di Basofili  
intorno all'epitelio ghiandolare**



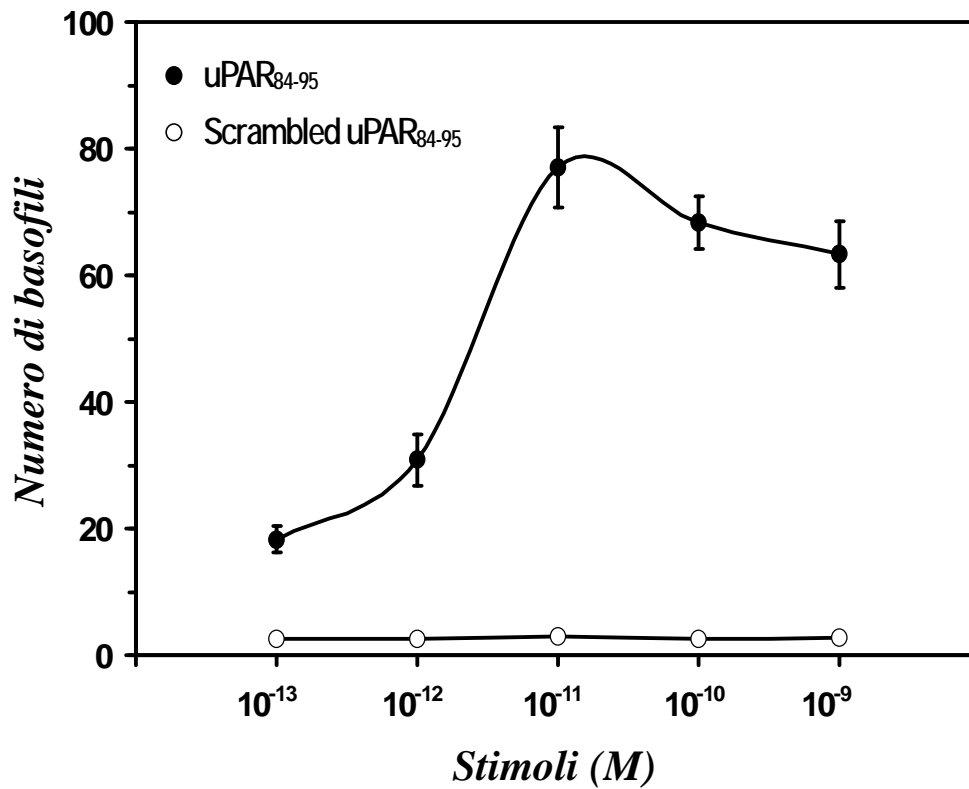
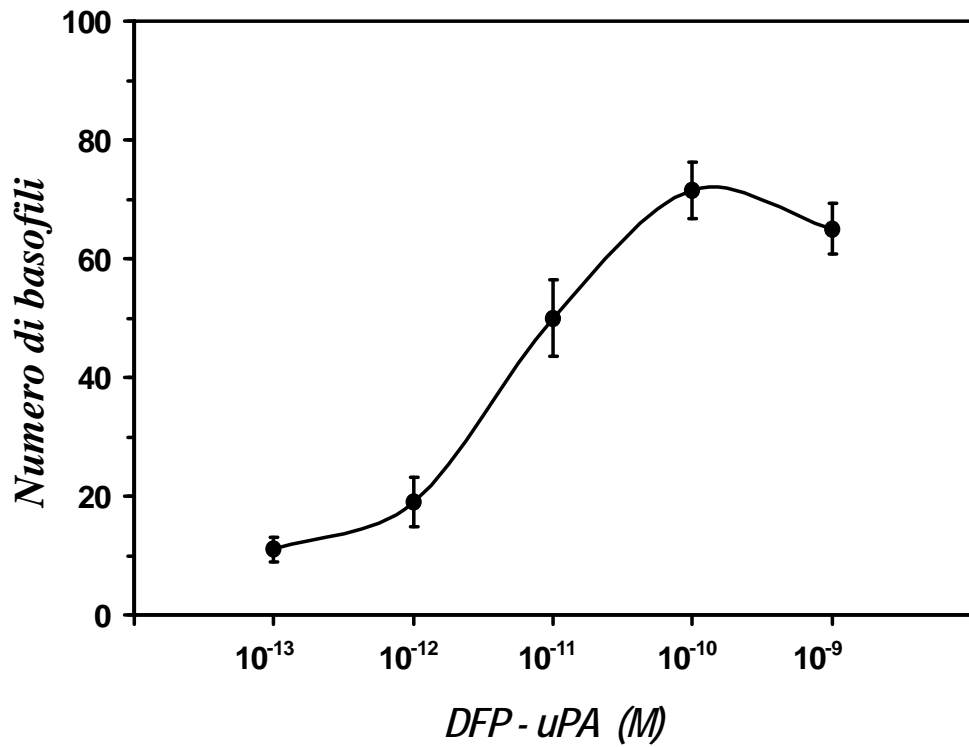
**Figura 5 - Mucosa gastrica di pazienti con infezione cronica da *Helicobacter pylori*.**

I basofili umani sono stati identificati utilizzando un anticorpo monoclonale (BB1) che riconosce specificamente la basogranulina presente selettivamente nei granuli.



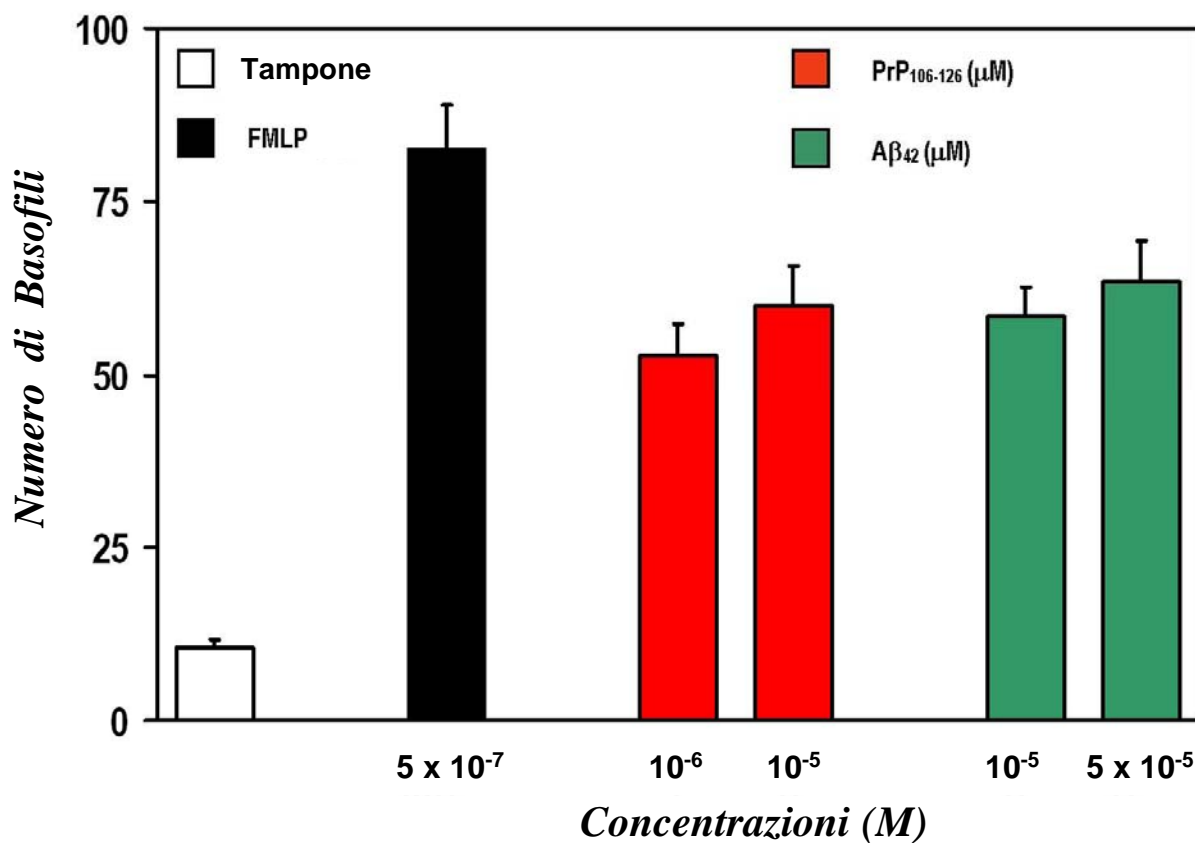
**Figura 6 - Effetto di concentrazioni scalari di Hp(2-20) e di Hp1 sulla chemiotassi dei basofili umani.**

I basofili purificati dal sangue periferico di donatori negativi per *H. pylori*, HIV-1 ed HIV-2. Hp(2-20) è in grado di indurre la chemiotassi dei basofili. Il peptide di controllo Hp1 è risultato inattivo. I risultati ottenuti rappresentano la media  $\pm$  ESM di cinque esperimenti.



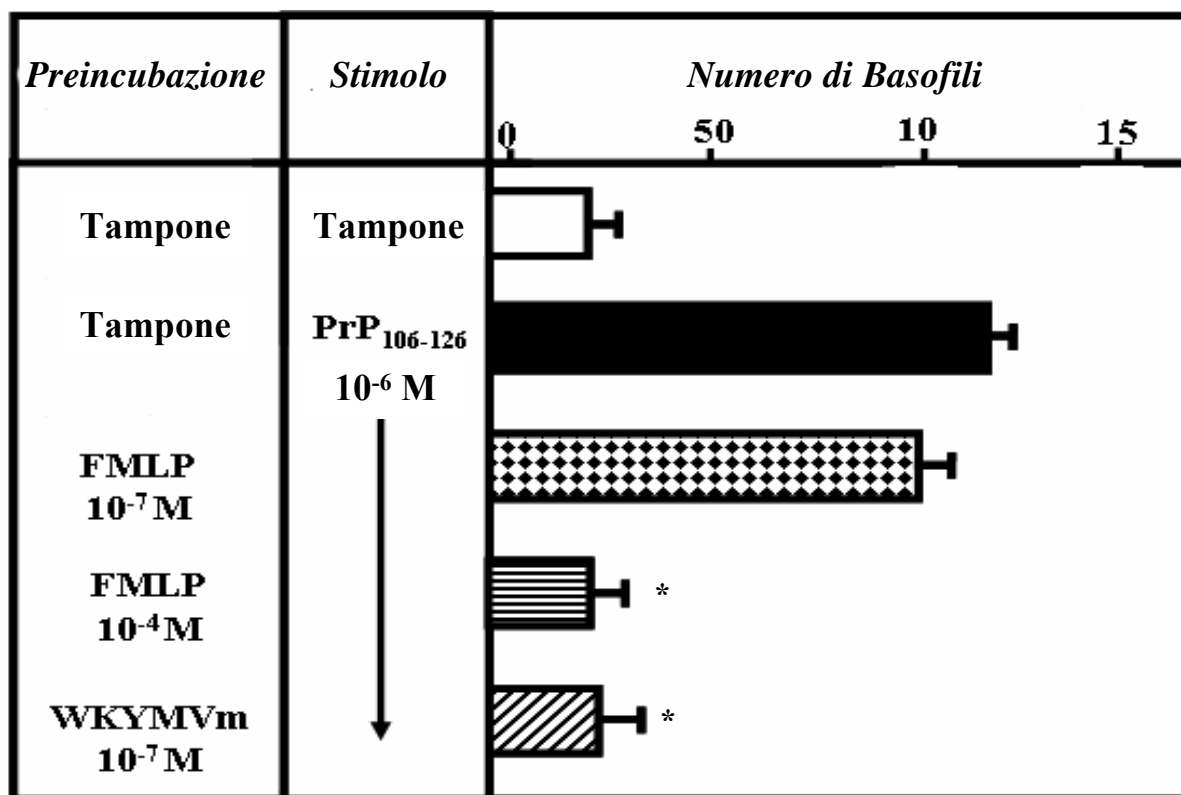
**Figura 7 - Effetto di uPA ed uPAR<sub>84-95</sub> sulla chemiotassi dei basofili umani.**

I risultati mostrano che concentrazioni subnanomolari ( $10^{-13}$  -  $10^{-9}$  M) di uPA e concentrazioni picomolari ( $10^{-3}$  -  $10^{-9}$  M) di uPAR<sub>84-95</sub> sono in grado di indurre la chemiotassi dei basofili umani ottenuti dal sangue periferico di donatori sani.



**Figura 8 - Effetto di PrP<sub>106-126</sub> (1-10  $\mu$ M) e A $\beta_{42}$  (10-50  $\mu$ M) sulla chemiotassi dei basofili umani.**

I basofili purificati dal sangue periferico di donatori negativi per HIV-1 ed HIV-2, sono stati stimolati con fMLP ( $5 \times 10^{-7}$  M), PrP<sub>106-126</sub> ( $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  M) e A $\beta_{42}$  ( $10^{-5}$  -  $5 \times 10^{-5}$  M). Gli esperimenti effettuati dimostrano che sia la proteina  $\beta$  amiloide che l'isoforma patologica del peptide prionico sono in grado di indurre la chemiotassi dei basofili umani.



**Figura 9 - Desensibilizzazione eterologa tra PrP<sub>106-126</sub>, fMLP e WKYMVm.**

I basofili sono stati preincubati con tampone, fMLP a basse concentrazioni (10<sup>-7</sup> M), fMLP ad alte concentrazioni (10<sup>-4</sup> M), o con il peptide sintetico WKYMVm (10<sup>-7</sup> M) per 30 minuti a 37°C. Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate e risospese in PACGM ed indotte a migrare verso PrP<sub>106-126</sub> (10<sup>-6</sup> M). La risposta chemiotattica a PrP<sub>106-126</sub> è risultata significativamente desensibilizzata dalla preincubazione con fMLP ad alte concentrazioni e con WKYMVm. I risultati ottenuti rappresentano la media ± ESM di sei esperimenti.

\* p < 0.01 confrontati con basofili stimolati con PrP<sub>106-126</sub>.