

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

Fisiopatologia clinica e Medicina Sperimentale ind.zzo Scienze Dermatologiche

XXII CICLO

Coordinatore: Prof. Gianni Marone

**Nuove ipotesi patogenetiche nel pemfigo indotto da farmaci: ruolo
dell'acetilcolinesterasi e meccanismi di autofagia**

**Il Relatore
Ch.mo Prof.re
Fabio Ayala**

**Il Candidato
Dott.ssa Marcella Petrazzuolo**

ANNO ACCADEMICO 2008-2009

INDICE

Obiettivo della ricerca.....pag.1

1. Introduzione

1.1 Pemfigo.....pag.4

1.2 Captopril.....pag. 10

1.3 Acantolisi.....pag. 11

1.4 Trasmissione colinergica.....pag. 12

1.5 Morte cellulare.....pag. 16

1.5.1 Apoptosi.....pag 17

1.5.2 Autofagia.....pag 21

1.5.3 Necrosi e necrosi programmata.....pag 24

2. Materiali e Metodi

2.1 Preparazione captopril, acido tannico, allyldimhetylsulfide e ampicillina.....

.....pag 25

2.2 Preparazioni degli inibitori della morte cellulare Z-IETD-FMK, IETD-FMK

.....pag 25

2.3 Colture cellulari.....pag 26

2.4 Analisi morfologicapag 27

2.5 RT-PCR.....pag 27

2.6 Estrazione di proteine e western blot.....pag 29

2.7Acetylcholine/acetylcholinesterase assay.....pag.31

3. Risultati

3.1 Effetto del captopril sulla produzione di AChE in HaCat e NHEK.....pag 32

3.2 L'augmentata espressione di AChE è associata ad un aumento di degradazione di ACh.....	pag 38
3.3 Effetto del captopril sulle molecole coinvolte nell'adesione cellulare.....	pag 40
3.4 Attivazione di pathway di morte cellulare da parte di acido tannico, allyldimetylsulfide e ampicillina su cellule HaCat.....	pag 42
Discussione	pag.49
Bibliografia	pag. 60

OBIETTIVO DELLA RICERCA

Il pemfigo è una malattia autoimmune potenzialmente letale, che interessa la cute e le mucose, caratterizzata dal distacco delle cellule dell'epitelio stratificato (acantolisi). Il pemfigo si sviluppa in seguito ad un' interazione tra fattori endogeni (genetici) ed esogeni. Infatti, in letteratura sono riportati differenti casi di sviluppo o esacerbazione della malattia in pazienti direttamente esposti a pesticidi, o sottoposti al trattamento con farmaci come il captopril o l'enalapril per periodi prolungati, oppure in pazienti che assumono regolarmente alcuni cibi contenenti tannini o vegetali appartenenti alla specie *Allium* (Raff, 1993; Hetts 1998, Thomberry, 1998; Nicholson, 1999; Gervais, 1999; Ona, 1999; Contassot, 1999). Gli anticorpi circolanti, prodotti nel corso della malattia, sono considerati responsabili della formazione di bolle e di erosioni della pelle e delle mucose.

Questo progetto di ricerca è stato suddiviso in due fasi.

Nella prima fase è stato valutato l'effetto del captopril sul metabolismo dell'acetilcolina, in cheratinociti umani. L'acetilcolina (ACh) è un importante mediatore dell'adesione cellulare che interviene sulla crescita, differenziazione, adesione, motilità, formazione della barriera cellulare, secrezione ghiandolare e modulazione della microcircolazione (Kurzen *et al.*, 2007). I cheratinociti umani sintetizzano acetilcolina non neuronale, che agisce a livello locale,

regolando alcune funzioni cellulari come proliferazione, adesione cellulare, contatti cellulari mediati dai desmosomi (barriera funzione) e attività ghiandolare (Wessler *et al.*, 2003). Il pemfigo è caratterizzato dalla presenza di autoanticorpi diretti contro la desmogleina 1 e la desmogleina 3. Oggigiorno è stato però dimostrato che tra i vari autoanticorpi ci sono anche quelli diretti contro le subunità dei recettori dell'acetilcolina $\alpha 3$ e $\alpha 9$ e la pemfissina. In particolare, gli autoanticorpi diretti verso i recettori dell'acetilcolina sono stati trovati nell'85% dei pazienti con pemfigo volgare e pemfigo foliaceo.

A tale proposito, l'interesse del nostro lavoro è stato rivolto alla modulazione dell'acetilcolina durante le manifestazioni acantolitiche del pemfigo. In particolare, è stato valutato se il captopril, noto induttore di pemfigo, potesse interferire con il rilascio di Ach, modulando l'acetilcolinesterasi (AChE), enzima deputato alla sua degradazione. Mediante RT-PCR e western blot sono stati valutati i livelli di espressione di AChE, in colture primarie di cheratinociti (NHEK) e HaCat trattati con captopril. In seguito, per valutare l'effetto del captopril su AChE, è stato eseguito un saggio enzimatico. Infine, per valutare l'effetto della riduzione di ACh sulla coesione cellulare è stata analizzata l'espressione di alcuni geni coinvolti nell'acantolisi quali la metalloproteinasi 9 (MMP-9), la desmogleina 3 (DSG3), la caspasi 3 e la caderina E.

Nella seconda parte del progetto, sono stati analizzati i pathway di morte cellulare attivati da differenti molecole, noti induttori di pemfigo. Scopo di questa seconda fase è di verificare se nella patogenesi del pemfigo intervengono diversi pathway di morte cellulare oltre a quello accertato di tipo apoptotico. Essendo, il pemfigo una malattia multifattoriale, l'attenzione si è focalizzata sul pemfigo indotto da farmaci e da molecole presenti negli alimenti. Colture primarie di cheratinociti (NHEK) e HaCat sono stati trattati con acido tannico, derivato allilico e ampicillina, tutti noti induttori di pemfigo, per valutare mediante RT-PCR i livelli di espressione di beclin-1 e μ -calpain, rispettivamente marcatori di autofagia e necrosi programmata. Inoltre, è stata valutata l'espressione della MMP-9, DSG3, caspasi 3 e caderina E. Gli esperimenti sono stati condotti anche in presenza di inibitori specifici per l'apoptosi.

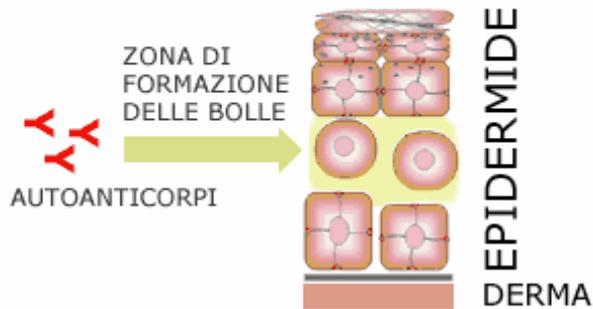
1. INTRODUZIONE

1.1 Pemfigo

Il pemfigo è una malattia autoimmune potenzialmente letale che interessa la cute e le mucose, caratterizzata dal distacco delle cellule dell'epitelio stratificato (acantolisi). Il pemfigo si sviluppa, in seguito a un'interazione tra fattori endogeni (genetici) ed esogeni. La predisposizione genetica è associata ad antigeni dei leucociti umani (HLA), in particolare DR4, 14; DQ 1,3. Il solo background genetico, sebbene essenziale, non è sufficiente ad innescare la malattia. L'intervento di fattori esogeni inducenti o scatenanti come pesticidi, tumori, farmaci, ormoni, infezioni, alimenti, radiazioni ultraviolette e stress sembra essere cruciale per indurre la malattia. Infatti, sono riportati differenti casi di sviluppo o esacerbazione della malattia in pazienti direttamente esposti a pesticidi o sottoposti al trattamento con farmaci come il captopril o l'enalapril per periodi prolungati, oppure in pazienti che assumono regolarmente alcuni cibi contenenti tannini o vegetali appartenenti alla specie *Allium* (Ruocco & Ruocco, 2003; Brenner *et al.*, 1994; Lambert *et al.*, 1986; Brenner *et al.*, 2000; Ruocco *et al.*, 1996). Gli anticorpi circolanti, prodotti nel corso della malattia, sono considerati responsabili della formazione di bolle e di erosioni della pelle e delle mucose. Oggi si ritiene che molteplici classi di fattori target, giochino un ruolo nella genesi dell'acantolisi; tra

questi di maggiore importanza sono considerate le caderine desmosomiali (desmogleina 1 e 3), i classici antigeni del pemfigo, ma anche altri antigeni tra cui il recettore dell'acetilcolina, la placoglobina, la pemfassina e il collagene (Lanza *et al.*, 2006). Da ciò si evince che l'acantolisi nel pemfigo è il risultato di un'azione cooperativa di anticorpi contro differenti antigeni self dei cheratinociti, ma il meccanismo con cui si verifica questo collasso epiteliale non è stato ancora chiarito. Negli ultimi anni, tuttavia, si sta rafforzando l'ipotesi che l'apoptosi giochi un ruolo centrale nell'induzione delle lesioni del pemfigo, portando così all'acantolisi. I principali tipi di pemfigo sono quello *volgare* (PV), quello *foliaceo* (PF), quello *paraneoplastico* (PNP), e quello *bolloso* (PB) che, si differenziano in base alla desmogleina colpita dagli autoanticorpi e dalla posizione delle bolle nei diversi strati dell'epidermide (Fig.1).

PEMFIGO VOLGARE



PEMFIGO FOLIACEO

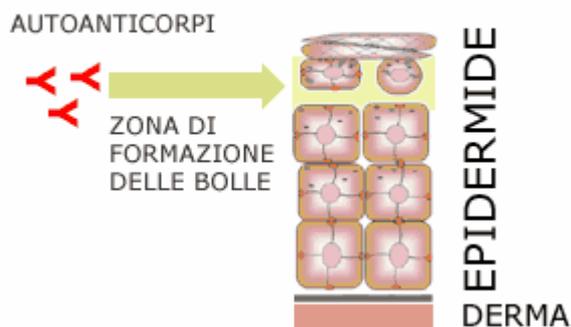


Figura 1. Tipi comuni di pemfigo

La forma più frequente è il *pemfigo volgare* (Fig.2) che colpisce la parte dell'epidermide a livello dello strato spinoso, provocando la formazione di bolle nelle membrane mucose con ulcerazioni dolorose, mentre nella cute si formano bolle simili a quelle provocate dalle ustioni.



Figura 2. Pemfigo volgare

Il *pemfigo foliaceo* (Fig.3) non colpisce le mucose, ma solo la parte superficiale dell'epidermide, con rare bolle intatte e fastidiose lesioni erosive.



Figura 3. Pemfigo foliaceo

Il *pemfigo paraneoplastico* è la forma più grave, ma fortunatamente anche la più rara, nella quale gli autoanticorpi attaccano oltre alle desmogleine anche altre molecole della cute e delle membrane mucose, sempre in associazione con una neoplasia, spesso maligna, che in alcuni casi viene scoperta indagando sui sintomi del pemfigo. Oltre a colpire la

cute e le membrane mucose questa forma spesso coinvolge anche le vie aeree inferiori.

Il *pemfigo bolloso* (PB) è la forma più comune di dermatosi bollosa autoimmune, con un'incidenza stimata a 1/40.000. La malattia colpisce prevalentemente gli anziani, ma è stata descritta anche nei bambini. Questa malattia è caratterizzata immunologicamente dalla presenza di autoanticorpi diretti contro due proteine strutturali, presenti negli emidesmosomi della giunzione dermo-epidermica. Queste proteine, dette PB antigene 1 (BPAG1 o AgBP230) e PB antigene 2 (BPAG2 o AgBP180 o collagene XVII) hanno un peso molecolare di 230 e 180 kDa, rispettivamente. Clinicamente, il PB è caratterizzato da bolle fisse, a contenuto chiaro, spesso grandi, che si sviluppano soprattutto sul bordo delle placche eritematose; associate di solito ad un forte prurito. La forma infantile esordisce dopo il primo anno di vita, con lesioni bollose sulla cute eritematosa o sulla cute normale delle estremità. Sono stati descritti rari casi familiari. In alcuni casi, la prognosi del PB è molto grave. Trattandosi di una malattia rara, la diagnosi del pemfigo non è immediata e la presenza delle lesioni e della loro localizzazione non è sufficiente. E' necessario ricorrere ad una biopsia (Fig.4) con relativo esame istologico sulle lesioni, eseguendo un'immunofluorescenza sulla biopsia cutanea che permette di identificare gli autoanticorpi che

provocano la degradazione delle desmogleine. Tali esami vengono poi approfonditi anche mediante test del sangue.

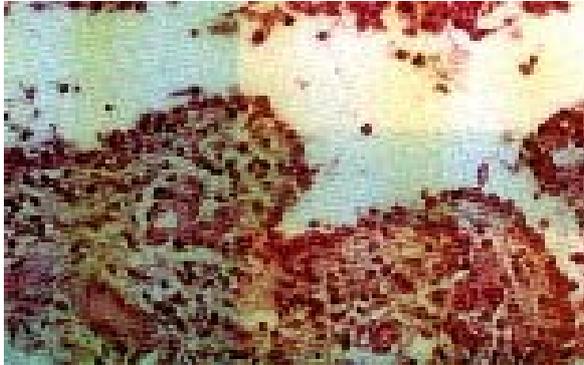


Figura 4. Biopsia di pemfigo volgare

Una volta formulata la diagnosi si può ottenere un controllo della malattia con terapie farmacologiche adeguate. Il farmaco di elezione per bloccare la reazione autoimmune è il cortisone ad alto dosaggio, che anche dopo la scomparsa delle manifestazioni cutanee viene impiegato in piccole dosi di mantenimento. Per abbreviare il decorso del pemfigo e l'uso di dose massicce di cortisone, per un lungo periodo, vengono associati altri immunosoppressori come l'azatioprina, la ciclofosfamida, la ciclosporina e, in casi particolari, si impiegano farmaci come il dapsona, i sali d'oro, le immunoglobuline e l'idrossiclorochina.

1.2 Captopril

Il captopril è il nome del principio attivo di indicazione specifica contro l'ipertensione. Appartiene alla classe farmacologica degli ACE inibitori e alla classe chimica dei derivati sulfidrilici (Fig. 5).

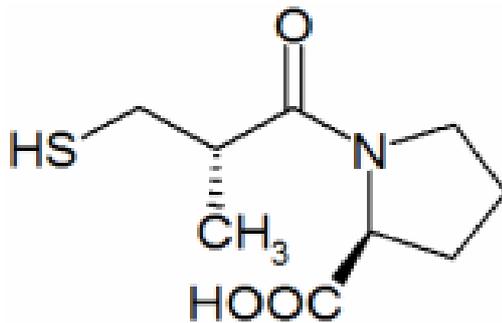


Figura 5 Struttura del captopril

Il captopril interagisce con il sito catalitico dell'enzima convertente ACE (Angiotensin-Converting Enzyme) impedendo l'ingresso del substrato angiotensina I e di conseguenza impedendone la conversione ad angiotensina II, importante mediatore ipertensivo. È utilizzato come medicinale in cardiologia contro l'ipertensione, episodi di scompenso cardiaco e in seguito ad infarto miocardico acuto; al di fuori dell'ambito cardiologico è usato per la nefropatia diabetica. Nel 2004 il gruppo del prof. Ruocco ha pubblicato un lavoro in cui si dimostrava la capacità del siero di pemfigo e del captopril di indurre apoptosi in cheratinociti umani (Baroni *et al.*, 2004).

1.3 Acantolisi

L'acantolisi è un fenomeno che si riscontra nel rigonfiamento, o edema cutaneo. Consiste nella distruzione dei ponti intercellulari che legano tra di loro le cellule dello strato spinoso dell'epidermide. Tali cellule, che vanno incontro ad alterazioni degenerative, tendono a staccarsi e a cadere separatamente o in ammassi nelle cavità formate dall'edema sottostante (Fig.6).

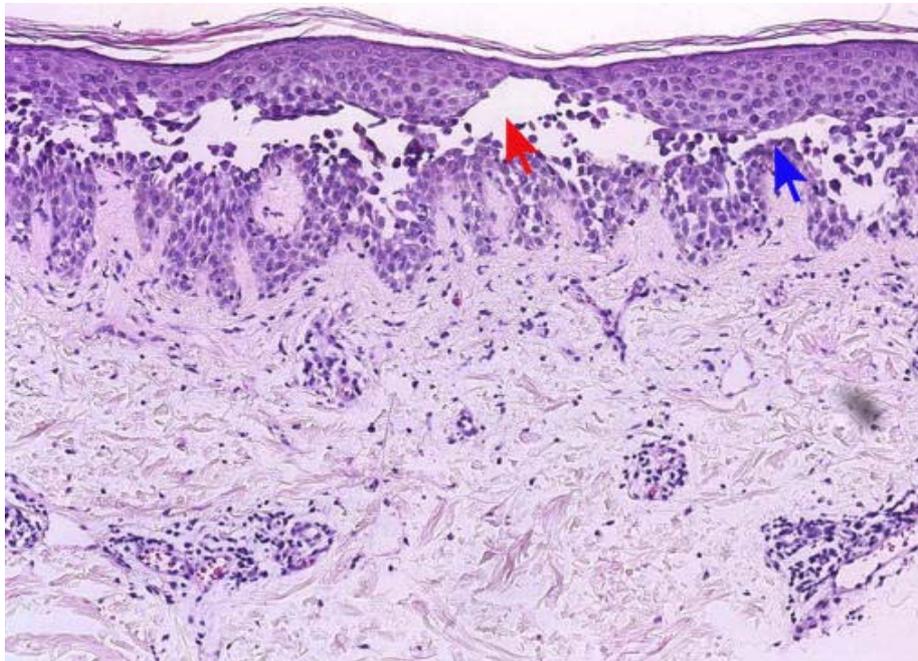


Figura 6. Acantolisi : Acantolisi / Epidermide soprabasale

Oggi si ritiene che molteplici classi di fattori target giochino un ruolo nella genesi dell'acantolisi; tra questi di maggiore importanza sono considerate le caderine desmosomiali : la desmogleina 1 e 3 (Dsg1 e Dsg3), i classici antigeni del pemfigo, e numerosi altri antigeni tra cui il recettore dell'acetilcolina (Lanza *et al.*, 2006). L'acantolisi nel

pemfigo è quindi il risultato di un'azione cooperativa di anticorpi differenti che portano ad un collasso epiteliale, il cui meccanismo non è stato ancora chiarito. Negli ultimi anni, tuttavia, è stato dimostrato che l'apoptosi gioca un ruolo centrale nell'induzione delle lesioni del pemfigo, portando così all'acantolisi. In particolare, molti dati sperimentali rivelano che l'apoptosi precede l'acantolisi nel pemfigo volgare. Infatti, alcuni inibitori delle caspasi prevengono l'acantolisi indotta da IgG di pemfigo (Arredondo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004).

1.4 Trasmissione colinergica

L'acetilcolina (Fig. 7) fu scoperta per caso da Reid Hunt nel 1900, mentre conduceva studi sull'adrenalina nelle ghiandole surrenali. Tale molecola era responsabile della diminuzione della pressione sanguigna determinata dagli estratti del surrene.

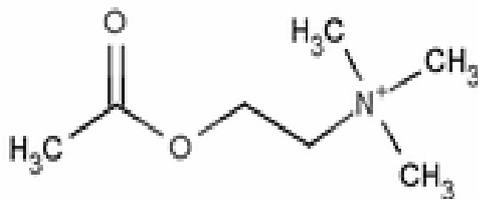


Fig 7. Struttura dell'acetilcolina

L'acetilcolina viene sintetizzata all'interno delle terminazioni nervose a partire dalla colina, che viene captata dalla terminazione

stessa mediante un sistema di trasporto specifico. La colina libera all'interno del terminale nervoso viene acetilata da un enzima citosolico, la colina acetiltransferasi (CAT); i gruppi acetici vengono forniti dall'acetil-CoA (Fig. 8).

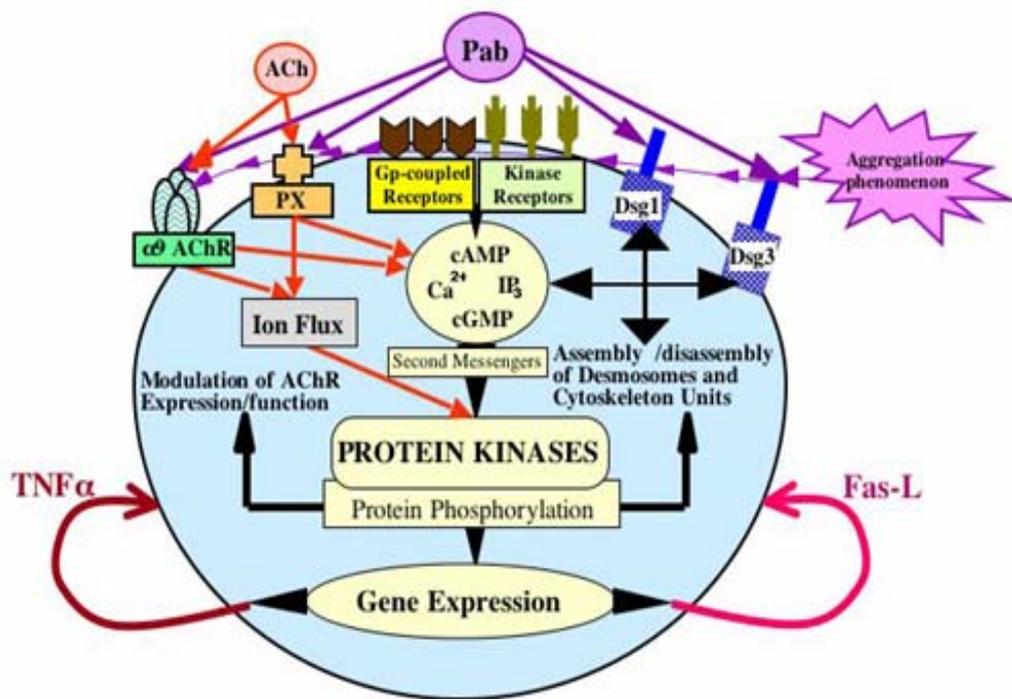


Figura 8. Pathway metabolici attivati dal rilascio di acetilcolina

L'enzima acetilcolinesterasi (Fig. 9) è presente nelle terminazioni nervose presinaptiche, e idrolizza continuamente l'acetilcolina che poi viene subito risintetizzata.

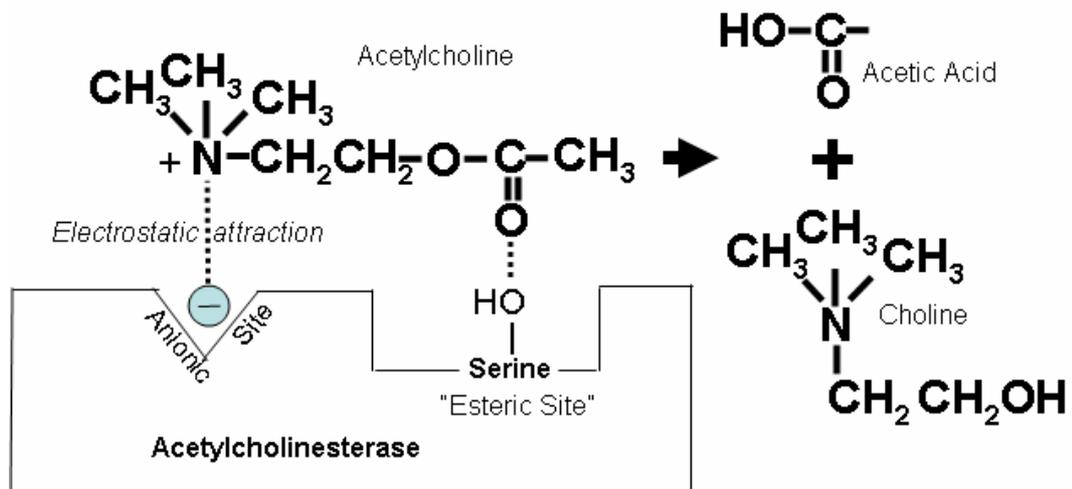


Figura 9. Degradazione enzimatica dell'acetilcolina da parte dell'acetilcolinesterasi.

L'inibizione della colinesterasi presente all'interno della terminazione determina l'accumulo nel citosol dell'acetilcolina. La maggior parte dell'acetilcolina sintetizzata viene tuttavia immagazzinata all'interno delle vescicole sinaptiche, nelle quali la sua concentrazione risulta pertanto molto alta (circa $100 \text{ mM} \times \text{L}^{-1}$), e da dove l'esocitosi dell'acetilcolina è attivata dall'ingresso di calcio. Dopo il suo rilascio, l'acetilcolina diffonde nella chiave sinaptica e si lega ai recettori postsinaptici determinando la depolarizzazione della membrana.

L'acetilcolina agisce a livello dei recettori nicotinici e muscarinici presenti a livello del sistema nervoso periferico e anche sui cheratinociti epidermici.

Infatti, l'acetilcolina è un importante mediatore dell'adesione cellulare. I cheratinociti umani sintetizzano acetilcolina non neuronale, che agisce a livello locale, regolando alcune funzioni cellulari come: proliferazione, adesione cellulare, contatti cellulari mediati dai desmosomi (barriera funzione) e attività ghiandolare. In particolare, a livello cheratinocitario essa interviene sulla crescita, differenziazione, adesione, motilità, formazione della barriera cellulare, secrezione ghiandolare, regolazione della microcircolazione e sui più importanti processi di riepitelizzazione (Kurzen *et al.*, 2007). I cheratinociti epidermici hanno gli enzimi deputati alla sintesi e alla degradazione dell'ACh. I recettori cheratinocitari dell'acetilcolina regolano l'adesione cellulare mediante due tipi di eventi biochimici. Gli eventi ionici generati dall'apertura dei canali ionici associati all'ACh, possono alterare il potenziale di membrana e indurre cambi conformazionali delle molecole di adesione. Gli eventi metabolici attivati dai recettori muscarinici possono attivare una serie di eventi intracellulari come l'attivazione proteinchinasi e fosfatasi, che alterano le funzioni delle molecole di adesione. Entrambi gli eventi possono quindi indurre dei segnali intracellulari, che si traducono nell'alterazione della funzione delle molecole di adesione. L'effetto stimolatorio dell'ACh nel mediare l'adesione dei cheratinociti può essere riprodotto sia dagli agonisti nicotinici che da quelli muscarinici. Inoltre, i cheratinociti rispondono ai trattamenti con i farmaci colinergici con drastici cambi di

vitalità (Grando, 2004). Entrambe le classi di agonisti colinergici possono anche proteggere dall'acantolisi indotta da anticorpi di pemfigo volgare e revertire l'acantolisi prodotta da IgGs attraverso una tripsina-serina proteinasi o chelanti del calcio come l'acido etilendiamminatetraacetico. Tali osservazioni suggeriscono che le IgGs agiscono come antagonisti dei recettori dell'Ach e interrompono la stimolazione di questi ultimi da parte dell'Ach. Da ciò scaturisce un'alterazione della normale adesione dei cheratinociti e della motilità indotta dal pathway colinergico, attivando così l'acantolisi.

1.5 Morte cellulare

I traumi o lo stress metabolico possono provocare danni alle cellule dell'organismo, il quale ha la possibilità di scegliere di riparare il danno, promuovendo la sopravvivenza cellulare, oppure di eliminarlo, qualora il riparo non sia consentito. In tal caso, le cellule arrivano ad un "punto di non ritorno" che le porta alla morte cellulare programmata (PCD). Esistono diversi pathway di morte programmata. Alcuni sono mediati dalle caspasi, una specifica famiglia di cisteine proteasi, come l'apoptosi, altri sono caspasi indipendenti, come nell'autofagia (ACD), paraptosi, e necrosi programmata (Fig. 10).

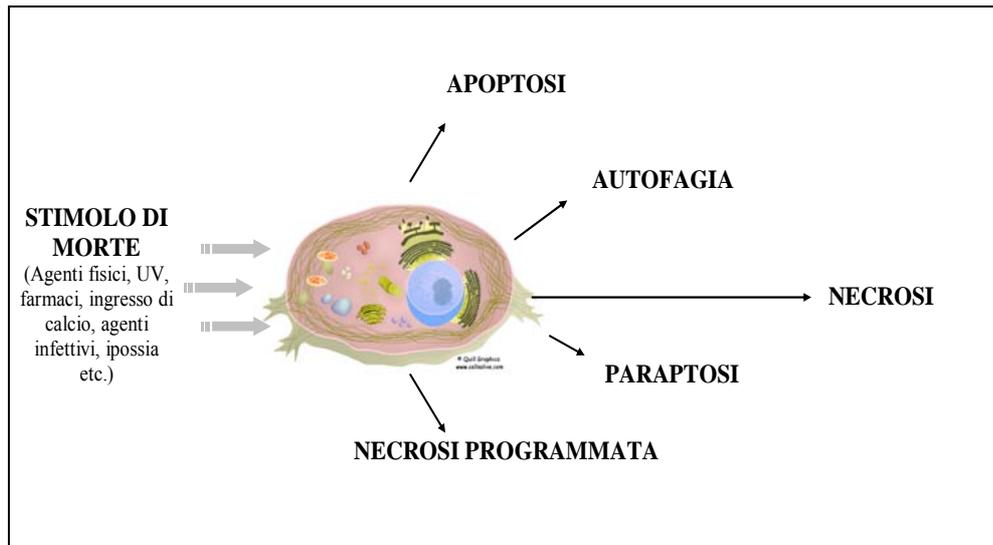


Figure 10. Vari modelli di morte cellulare

1.5.1 Apoptosi

L'apoptosi o processo di morte cellulare programmata, consente l'eliminazione di cellule prodotte in eccesso, sviluppate impropriamente oppure modificate geneticamente. Essa svolge un ruolo fondamentale nell'embriogenesi, nello sviluppo e nella regolazione del sistema immunitario, nei processi di rigenerazione del sistema tissutale, etc. L'apoptosi avviene attraverso una serie di stadi identificabili morfologicamente. Un evento precoce caratteristico di una cellula apoptotica è la perdita di contatto con le cellule vicine. Il nucleo diviene condensato formando dei frammenti cromatinici sparsi, e il citoplasma si contrae in seguito a perdita di liquidi rilasciati nell'ambiente extracellulare. La fase successiva del processo è caratterizzata dalla formazione di compartimenti citoplasmatici

delimitati dalla membrana plasmatica e denominati “corpi apoptotici”, i quali dopo essersi staccati dalla cellula vengono fagocitati dai macrofagi presenti nell’ambiente circostante (Quattrone & Capaccioli, 1995). La morte cellulare programmata richiede una regolazione attiva e coordinata di specifici geni. Alcuni componenti molecolari di tale processo sono stati conservati attraverso l’evoluzione. Studi genetici condotti sul nematode *Caenorhabditis elegans* hanno portato all’identificazione di mutazioni in quattordici geni che determinano l’apoptosi in questo organismo. Tre di questi geni (CED-3, CED-4, CED-9) sono essenziali per la morte cellulare programmata durante lo sviluppo embrionale di questo nematode (Duke *et al.*, 1996). Alcuni di questi geni possiedono un loro equivalente funzionale nei mammiferi: CED-9 è un membro della famiglia di Bcl-2, CED-3 è una caspasi che provoca la proteolisi di altre proteine (caspasi-3 o 6 o 7), CED-4 è un omologo di Apaf-1 (apoptosis activating factor). E’ stato dimostrato che alcuni membri della famiglia Bcl-2 (Bcl-xL e Bcl-W) sopprimono il processo apoptotico, mentre altri membri, quali Bax e Bcl-xS, aumentano la suscettibilità delle cellule agli stimoli apoptotici (Moroy *et al.*, 1996). Sebbene il meccanismo di azione antiapoptotica di Bcl-2 non sia ancora ben conosciuto, studi biochimici dimostrano che tale proteina è implicata nella regolazione del potenziale redox mitocondriale. Infatti, sembra che essa sia capace di bloccare il rilascio

del citocromo c a livello mitocondriale, impedendo così la formazione del complesso Apaf-1/cyt-c/dATP attivatore della cascata delle caspasi. Il recettore che trasmette il segnale d'inizio dell'apoptosi più studiato è Fas (CD95/APO-1). Fas è una proteina transmembrana correlata alla famiglia del TNF, contiene un dominio di morte (FADD/MORT 1) ed è in grado di indurre l'apoptosi dopo il legame con il suo ligando (CD95-L). Quest'ultimo, è una proteina transmembrana correlata al TNF di tipo II. L'interazione Fas-R/Fas-L, comporta la morte per apoptosi delle cellule che esprimono Fas-R (Gulbins *et al.*, 1996). Le caspasi sono delle proteasi a cisteina (contengono un residuo di cisteina nel loro sito catalitico) che idrolizzano le proteine a valle di un residuo di acido aspartico e svolgono un ruolo centrale nell'apoptosi. Le caspasi esistono normalmente nelle cellule come proenzimi inattivi (pro-caspasi) che possono essere attivati mediante due distinti meccanismi: il primo prevede il coinvolgimento di un segnale recettoriale in cui il legame Fas-L/Fas-R attiva la proteina FADD (proteina Fas associata con un dominio di morte) che a sua volta attiva una cascata proteolitica dei principali componenti della famiglia delle caspasi (Fas-L/Fas-R → FADD → caspasi 8 (iniziatrice) → caspasi 3 (esecutrice) → caspasi esecutrici 6, 7, 2); il secondo meccanismo prevede il rilascio dai mitocondri del citocromo c in seguito a vari stimoli come siero o deprivazione dei fattori di crescita,

ROS, ioni calcio, proteine pro-apoptotiche. Il citocromo c reagendo con Apaf-1 e dATP produce la formazione di un complesso ternario (cyt c/Apaf-1/dATP) capace di attivare la caspasi 9 (iniziatrice), che a sua volta induce l'attivazione di tutte le successive caspasi effettrici (Vaux *et al.*, 1999; Adams & Cory, 1998) (Fig. 11).

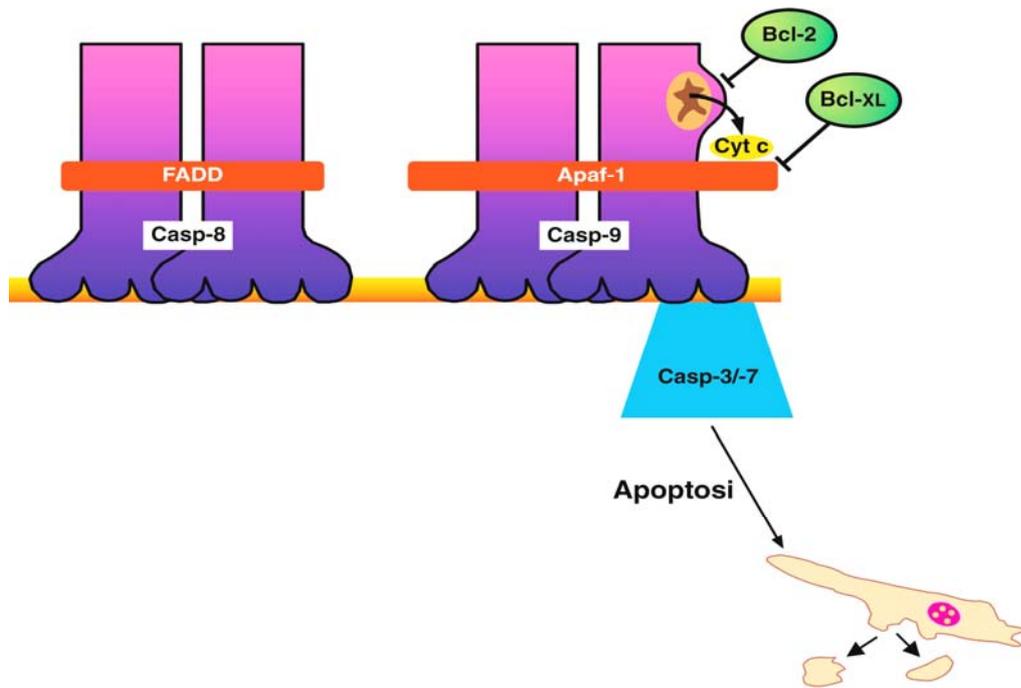


Figura. 11 Meccanismo apoptotico caspasi-mediato via FADD/CASPASI 8 e/o via Apaf-1/CASPASI

Uno dei geni più importanti coinvolti nella trasmissione del segnale di morte apoptotica è p53, la cui funzione è di raccogliere il messaggio di danno al DNA genomico e mediarne la traduzione nell'arresto del ciclo cellulare, prima della fase di sintesi riparativa del DNA, impedendo così che il danno iniziale ne favorisca altri, consentendo la riparazione finale (Quattrone & Capaccioli, 1995).

1.5.2 Autofagia

La morte cellulare autofagica (ACD, Autophagic cell death) è un tipo di morte cellulare programmata non apoptotica, anche chiamata morte cellulare di tipo II, per distinguerla dall'apoptosi o morte

cellulare di tipo I (Gozuacik *et al.*, 2004). La fagocitosi e l'autofagia sono due processi molto antichi, altamente conservati, coinvolti nella rimozione di organismi extracellulari e la distruzione di organelli del citosol. L'autofagia, per regolazione metabolica o per un meccanismo di difesa, è caratterizzata dalla formazione di una doppia membrana chiamata autofagosoma, che in seguito si fonde con i lisosomi per degradare il suo contenuto con un processo che è simile alla maturazione del fagosoma. Infatti, l'autofagia è normalmente attivata durante la starvation dai sensori dei nutrienti, permettendo così il riciclaggio di substrati e organelli e assicurando i precursori metabolici (Danial & Korsmeyer, 2004). Inoltre, l'autofagia è anche una via per eliminare organelli non funzionali, e favorire il turnover di proteine di lunga vita, prevenendo così il loro accumulo patologico nella cellula. Di conseguenza, la cellula “cannibalizza se stessa” dall'interno (self-eating) (autophagia deriva dal greco = mangiare se stesso). Quando il “self eating” raggiunge elevati livelli, può sfociare in ACD; quest'ultima interviene durante l'embriogenesi, nel rimodellamento dei tessuti adulti, in caso di alcune patologie, e durante trattamento con farmaci citotossici (Gozuacik & Kimchi, 2004). L'ACD è caratterizzata da alcune peculiarità che la differenziano dall'apoptosi: la formazione di autofagosoma-autolisosoma, la digestione degli organelli, il nucleo e il citoscheletro integri fino agli ultimi stadi, e

infine l' assenza di DNA ladder. Al contrario dell'apoptosi, l'ACD è un meccanismo caspasi-indipendente. E' interessante sapere, che l'autofagia può sia favorire che prevenire il cancro, e il suo ruolo può essere alterato durante la progressione tumorale (Shintani & Klionsky, 2004). Il primo gene autofagico individuato nell'uomo fu beclin-1 (Yue *et al.*, 2003). Beclin è inibito dalla sua interazione con Bcl-2, che agisce sia come gene soppressore dell'apoptosi che dell'autofagia (Patingre *et al.*, 2005). Un altro aspetto da considerare è che alcuni tipi di cellule maligne rispondono ad alcuni agenti anti-cancro inducendo l'autofagia, indicando la potenziale utilità dell'autofagia per il cancro a livello terapeutico. Inoltre, le cellule di cancro possono indurre l'autofagia per sopravvivere in situazioni di carenza di nutrienti e di ossigeno, e quindi tale tipo di morte può proteggere le cellule dalle radiazioni ionizzanti rimuovendo gli elementi danneggiati. Il preciso ruolo di tale morte cellulare non è del tutto chiaro, ma è importante sottolineare che l'autofagia e l'apoptosi possono essere simultaneamente osservate nello stesso tessuto, e in alcuni casi l'autofagia può precedere l'apoptosi e dopo mutarsi in essa (Gozuacik *et al.*, 2004). In altre situazioni, l'autofagia può essere indotta per ritardare o antagonizzare l'apoptosi, e ci sono anche altri esempi in cui i due processi possono essere mutualmente esclusivi agendo come backup di altri processi di morte cellulare irreversibili.

1.5.3 Necrosi e necrosi programmata

Per molto tempo la necrosi è stata considerata l'alternativa alla morte cellulare programmata, l'apoptosi (Proskuryakov *et al.*, 2003; Fietta P, 2006). Recentemente è emerso che la necrosi è una forma alternativa di morte cellulare, la cui attivazione potrebbe avere un'importante conseguenza biologica (Edinger & Thompson, 2004). Alcuni elementi, come i recettori di morte, le cascate delle chinasi, e i mitocondri, partecipano ad entrambi i processi; infatti, modulando questi pathways, è possibile lo scambio tra apoptosi e necrosi. La necrosi programmata, come l'apoptosi, sembra essere una specifica forma di esecuzione della morte cellulare. Alcuni importanti esempi di necrosi sono documentati durante l'embriogenesi, durante il normale rinnovamento dei tessuti e la risposta immune (Proskuryakov *et al.*, 2003). Gli eventi cardine della necrosi programmata, sono la carenza bioenergetica e la rapida perdita di integrità della membrana plasmatica. Questo può risultare da eventi molecolari che occorrono durante la divisione cellulare, incluso l'aumento di produzione dei ROS, l'attivazione delle proteasi apoptotiche, e/o la distruzione di cofattori richiesti per la produzione di ATP. La cariolisi del nucleo è la conseguenza della completa dissoluzione della cromatina dovuta all'attività della DNasi specifica. Si è osservato che l'attivazione di calpain e delle catepsine lisosomiali contribuisce alla necrosi.

MATERIALI E METODI

2.1 Preparazione captopril, acido tannico, allyldimethylsulfide e ampicillina

Per lo studio dell'espressione dell'acetilcolinesterasi, il captopril (P.M=217.3g/mol) è stato dissolto nel mezzo cellulare ad una concentrazione finale di 0,5 M (il pH è stato corretto con NaOH). Per studiare i possibili pathway di morte cellulare attivati nel pemfigo, sono state prese in esame anche altre sostanze: acido tannico, ampicillina e derivato allilico. L'acido tannico (P.M=1701.2gr/mol) è stato diluito in PBS ad una concentrazione di 100 mM. L'allyldimethylsulfide (P.M=88g/mol) è stato disciolto in PBS ad una concentrazione finale di 11,1 M. L'ampicillina (P.M= 349,4g/mol) è stata risospesa nel mezzo cellulare ad una concentrazione di 1.5 mM..

2.2 Preparazione degli inibitori della morte cellulare: Z-IETD-FMK, IETD-FMK

Z-IETD-FMK, IETD-FMK sono inibitori irreversibili dell'apoptosi e legano rispettivamente, il sito attivo della caspasi 8 e 9 (Cryns & Yuan, 1998). I due inibitori sono stati diluiti nel terreno di coltura ad una concentrazione di 2mM e usati ad una concentrazione finale di 100 μ M.

2.3 Colture cellulari

Le colture primarie di cheratinociti (NHEK) sono state ottenute da biopsie chirurgiche di cute di adulti sani (Boyce & Ham, 1983) e tenute in mezzo di coltura per cheratinociti senza siero SFM (keratinocyte-serum free medium), supplementato con fattori di crescita (serum-free keratinocyte medium and growth factors, Life Technologies). La concentrazione totale di calcio è stata mantenuta a 0.09 mM (Svendsen *et al.*, 1997). Durante il trattamento la concentrazione totale di calcio nel mezzo di coltura è stata di 0,12 mM (Keratinocyte-KBM; Clonetics, San Diego, CA, USA). Le cellule HaCat sono state coltivate in terreno Dulbecco modificato (DMEM) supplementato con 10% siero fetale bovino, 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina, 2 mM l-glutamina at 37°C, 5% CO₂.

6x10⁵ cellule NHEK e HaCat sono state coltivate in piastre a 6 pozzetti (35mm di diametro) e trattate con 15 mM captopril (Sigma, Milano, Italia). Successivamente le cellule sono state raccolte per estrarre l'mRNA e le proteine, per le successive analisi mediante RT-PCR e Western Blotting, rispettivamente. Un altro set sperimentale è stato allestito per analizzare il rilascio di acetilcolina e l'attività dell'acetilcolinesterasi, utilizzando l' Ampex Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay kit (Molecular Probes, Invitrogen).

Le cellule HaCat 6×10^5 sono state coltivate in 6-well plates (35mm diameter) e trattate con 10 μ M di acido tannico, 9 mM allyldimethylsulfide e 100 mM ampicillina per 48 ore, per valutare l'espressione dei geni caratteristici dell'apoptosi (caspasi), autofagia (beclin-1) e necrosi programmata (μ - calpain). Ulteriori esperimenti sono stati condotti trattando le cellule HaCat prima con gli inibitori della morte cellulare apoptotica per 2 ore, e poi con 10 μ M acido tannico, 9 mM allyldimethylsulfide e 100 mM ampicillina per valutare eventuali differenti pathway di morte cellulare coinvolti nel pemfigo.

2.4 Analisi morfologica

Le caratteristiche morfologiche delle NHEK e HaCat sono state osservate al microscopio ottico a contrasto di fase (Olympus CDK40) con un ingrandimento di 10x e 20x.

2.5 RT-PCR

L'RNA totale delle cellule NHEK e HaCat è stato isolato mediante il kit High Pure RNA Isolation (Roche Diagnostics), dopo il trattamento con 15 mM di captopril. L'RNA è stato trascritto da una trascrittasi inversa (Expand Reverse Transcriptase, Roche Diagnostics) a 42°C per 45 minuti come da protocollo. 2 μ l di DNA complementare (cDNA) è stato amplificato in una miscela di reazione contenente 2,5

mM dNTP e 1 unità di Taq DNA polimerasi (Roche Diagnostics) in un volume finale di 25 μ l. La reazione è stata effettuata in un termociclatore (Eppendorf Mastercycler gradient). I geni coamplificati sono stati AChE, MMP9, Dsg3, caderina E, beclin-1 e μ -calpain. Per la co-amplificazione di AChE la PCR è stata effettuata in presenza di 0.5 μ M primers sense e antisense per AChE, e 0.05 μ M di primers sense e antisense GAPDH. Per la co-amplificazione di MMP9, Dsg3, beclin-1 o μ -calpain la PCR è stata effettuata in presenza di 0.5 μ M primers sense e antisense per MMP9, Dsg3, beclin-1, μ -calpain o caderina E e 0.05 μ M di primers sense e antisense per β -actin. Le condizioni e la grandezza dei prodotti sono riportate in tabella 1. Per l'amplificazione della caspasi 3, è stato usato un kit per l'espressione multipla di geni (Maxim Biotech, Inc, Ca). Le grandezze attese per i prodotti della PCR multiplex sono state di 200 bp, 256 bp, 320 bp, 405 bp, 498 bp e 615 bp, per caspasi 9, caspasi 5, caspasi 3, caspasi 8, APAF e GAPDH, rispettivamente. I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.8% in TBE.

Gene atteso	Sequenze sense e antisense	Condizioni	Prodotto
AChE	5'-GTAGCAGACACTCTGGAAGGTTG-3' 5'-GAGGATGCAGAGCTGCTGGTGAC-3'	35 cicli 94°C per 1', 58°C per 30", 72°C per 1'	201
MMP9	5'-gCCAACACTACgACACCgACgA-3' 5'- CgCTggTACAaggTCgAgTAC-3'	35 cicli 95°C per 45", 56°C per 1', 72°C per 1'	310
Dsg3	5'- ACCgAATCTCTggAgTgggAA-3' 5'-gCACCACTCACAACAAGACgAT-3'	35 cicli 95°C per 45", 56°C per 1', 72°C per 1'	467
caderina E	5'- TgAAggTGACAgAgCCTCTggAT-3' 5'-TgggTgAATTCgggCTTgTT-3'	35 cicli 95°C per 45", 56°C per 1', 72°C per 1'	200
beclin-1	5'-TCT ggg ACA ACA AGT TTg AC-3' 5'-CCA CTT AAG ATT CGT CAG CA-3'	32 cicli 94°C per 1', 53°C per 1', 72°C per 1'	235
μ-calpain	5'-CCT GCT TGA GAA GGC CTA TG 3' 5'-AGA GTG GAA CAA CGT GGA CC-3'	35 cicli 94°C per 1' 57°C per 1', 72°C per 1'	389
GAPDH	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3' 5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'		306

Tabella 1. Sequenze sense e antisense dei primers umani e prodotti PCR attesi (bp)

2.6 Estrazione di proteine e Western Blot

Le cellule NHEK e HaCat 6×10^5 sono state coltivate in 6-well plates (35mm diameter) e trattate con 15 mM di captopril per 48 h, per valutare l'espressione proteica di AChE. Le cellule sono state private del terreno e, dopo un lavaggio con 1 mL di PBS, sono state lisate con 300 μ l di buffer di lisi freddo (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% glicerolo, 1% Triton, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA) supplementato con 20 mM di sodio pirofosfato, 40 μ g/ml aprotinina, 4 mM PMSF, 10

mM sodio ortovanadato, 25 mM NaF. L'estratto totale è stato centrifugato a 10000 rpm per 30 min a 4°C e la concentrazione proteica è stata misurata con il metodo Bradford. Cinquanta µg di proteina di ogni lisato cellulare sono stati separati mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 12.5% e trasferiti su membrana di nitrocellulosa. I filtri sono stati colorati con una soluzione al 10% di Ponceau S per 2 minuti per verificare una eguale distribuzione dei campioni e un'efficiente trasferimento. Inoltre la normalizzazione proteica è stata verificata mediante analisi densitometrica delle bande. Il trasferimento è stato bloccato per tutta la notte con 5% non-fat dry milk, poi incubato con l'anticorpo AChE (clone H-134) rabbit policlonale (Santa Cruz) 1:200, in 3% non-fat dry milk 0.1% Tween-20 PBS per 2 ore a 4°C. In seguito al lavaggio con 0.1% Tween-20 PBS, il filtro è stato poi incubato con anticorpo coniugato con immunoglobuline perossidasi anti-rabbit diluito 1:2500 in 3% non-fat dry milk 0.1% Tween-20 PBS per 1 ora at 22°C. Infine il filtro è stato accuratamente lavato e analizzato mediante la metodica ECL (Amersham).

2.7 Acetylcholine/acetylcholinesterase assay

Le cellule NHEK e HaCat 6×10^5 celle sono state coltivate in 6-well plates (35mm diameter) e trattate con captopril 15mM per 48 ore. Le cellule sono state lavate due volte con PBS e screpate in 300 μ l di PBS freddo supplementato with 1% Triton X-100. Il pellet cellulare è stato poi ultrasonificato (Sonicator Ultrasonic Processor XL 2020, Gilson) per 25 secondi e incubato per 2 minuti in ghiaccio, per 3 volte. In seguito gli omogenati sono stati centrifugati per 10 minuti a 12,000 rpm (4°C), e i pellet cellulari così ottenuti, sono stati analizzati per valutare il rilascio di acetilcolina ed il rilascio/espressione dell'acetilcolinesterasi mediante l'Ampex Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay kit (Molecular Probes, Invitrogen). La fluorescenza è stata misurata in fluorescence microplate reader ad un'eccitazione di 560 nm ed una fluorescenza di 590 nm.

RISULTATI

3.1 Effetto del captopril sulla produzione di AChE in HaCat e NHEK

Per valutare se il captopril potesse modificare la produzione e il rilascio di Ach nei cheratinociti umani, mediante RT-PCR sono stati valutati i livelli di AChE in cellule HaCat e NHEK. In seguito al trattamento con captopril la morfologia di entrambe le linee cellulari risulta modificata, come indicato nelle figure 12B e D. In particolare, oltre ad un ridotto numero cellulare, alcune cellule appaiono modificate con una morfologia più fusiforme rispetto al monostrato di cheratinociti controllo. Questo dato ci conferma che il trattamento con captopril ha avuto effetto, come precedentemente pubblicato (Baroni *et al.*, 2004).

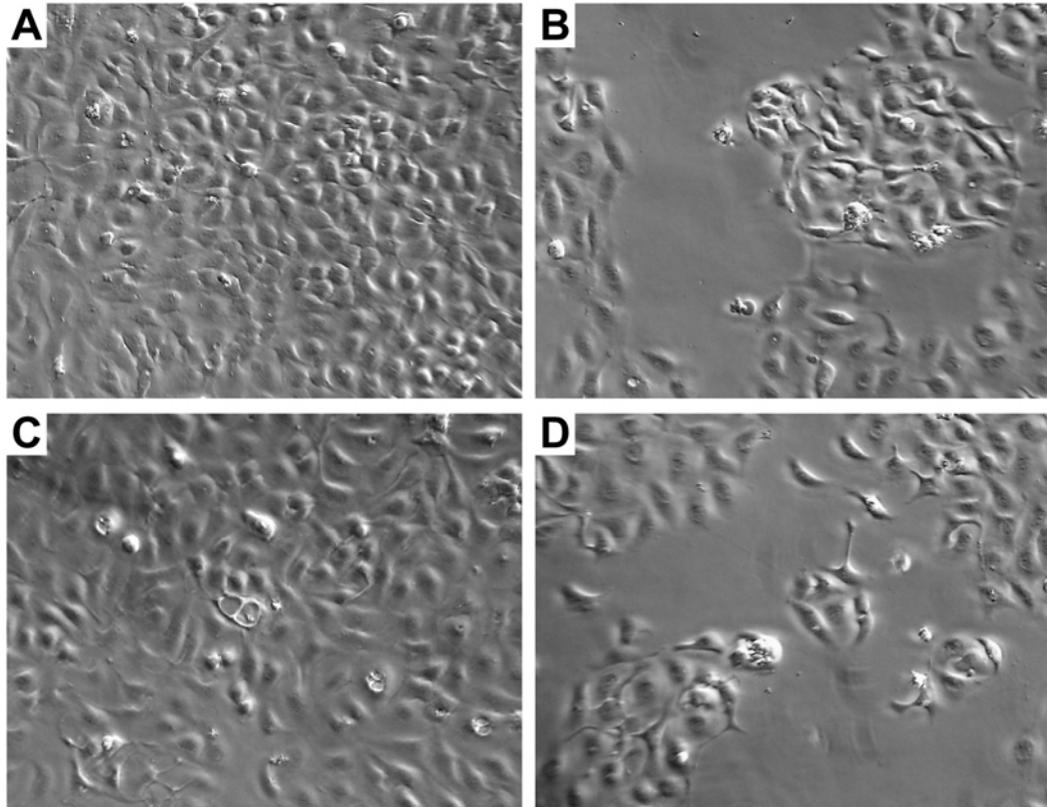


Figura 12. Effetto del captopril sulla morfologia cellulare di cellule HaCat (A, B) e cellule NHKE (C, D) (microscopio ottico a contrasto di fase). (A) Cellule HaCat controllo (48 h). (B) Cellule HaCat trattate con 15 mM captopril (48 h). (C) Cellule NHKE controllo (48 h). (D) Cellule NHKE trattate con 15 mM captopril (48 h). Ingrandimento: 20 X.

Successivamente, è stata valutata l'espressione di AChE. Come evidenziato in figura 13, è stato ritrovato un forte aumento dei livelli dell'espressione di mRNA in entrambe le linee cellulari trattate con captopril 15 mM, rispetto ai controlli non trattati (Fig. 13A). Tale risultato è confermato da analisi per western blot. Infatti, utilizzando uno specifico anticorpo per AChE l'analisi per western blot ha evidenziato una banda approssimativamente di 82 kDa che corrisponde al prodotto proteico di AChE (Fig. 13B).

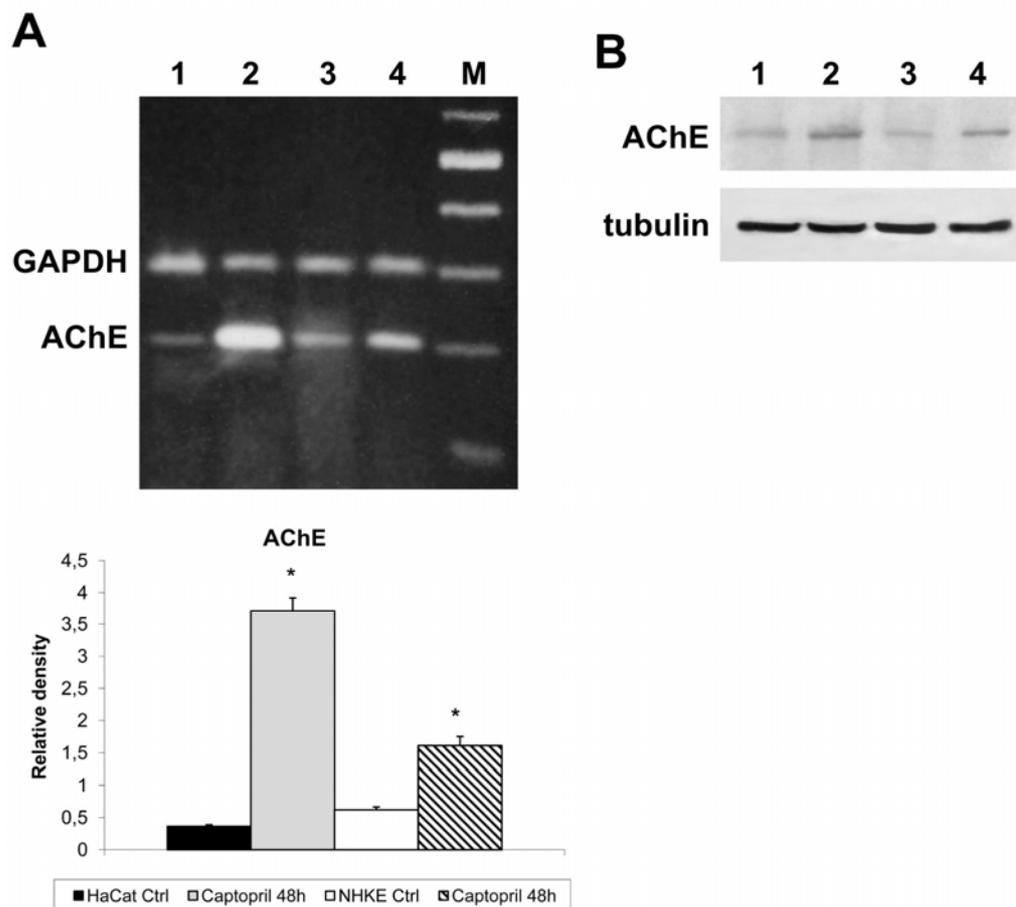


Figure 13. Analisi dei trascritti di Ache mediante RT-PCR (A) e Western blot (B). (A) Linea 1: cellule HaCat, linea 2: cellule HaCat trattate con 15 mM captopril (48 h); linea 3: cellule NHKE controllo; linea 4: cellule NHKE trattate con 15 mM captopril (48 h). M, 100 bp ladder MW-marker (Roche Diagnostics). In grafico è rappresentata la misurazione quantitativa dell'intensità delle bande, ottenuta mediante analisi densitometrica utilizzando uno specifico software per analisi delle immagini (NIH image 6.0). (B) Linea 1: cellule HaCat controllo; linea 2: cellule HaCat trattate con 15 mM captopril (48 h); linea, cellule NHKE controllo; linea 4, cellule NHKE trattate con 15 mM captopril (48 h). I dati mostrati sono rappresentativi di cinque esperimenti \pm SD. * Differenza significativa rispetto al controllo ($P < 0.05$).

Per valutare se il captopril avesse effetto anche sull'attività enzimatica della AChE, è stato adoperato un saggio enzimatico che utilizza acetilcolina pura come substrato. Aumentati livelli dell'attività dell'acetilcolinesterasi sono stati evidenziati nei lisati cellulari di cheratinociti trattati con captopril, rispetto alle cellule non trattate (Fig. 14). Prolungando il tempo di incubazione fino a 60 minuti, per favorire la cinetica di reazione, i risultati non sono cambiati (dati non mostrati).

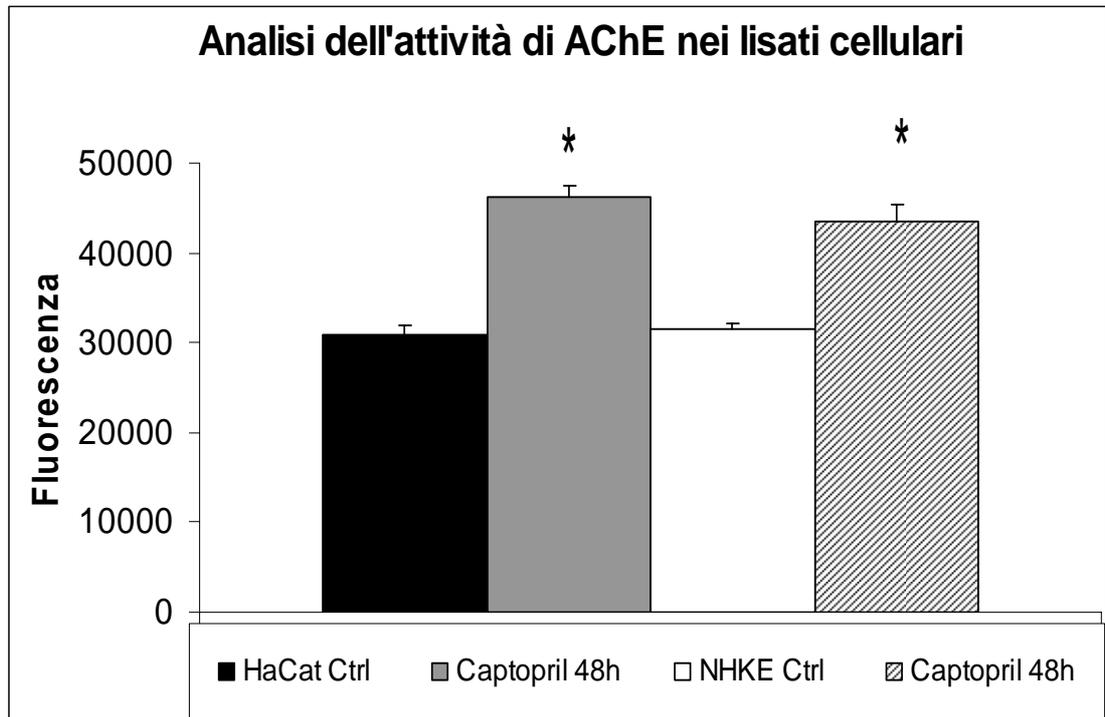


Figure 14. Analisi dell'attività dell'acetilcolinesterasi in HaCat e NHEK trattate con captopril usando l' Amplex Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit. Le cellule HaCat e NHEK sono state trattate con 15 mM captopril per 48 h. I dati sono presentati come media \pm SD dei risultati di cinque esperimenti indipendenti.

3.2 L'augmentata espressione di AChE è associata ad un aumento di degradazione di ACh.

Per valutare se AChE potesse indurre un'augmentata degradazione di ACh, è stata analizzata la sua concentrazione nel lisato e nel mezzo cellulare delle cellule HaCat e NHEK trattate con captopril. Come mostrato in Fig. 15 nelle cellule trattate con captopril la concentrazione di ACh è stata fortemente ridotta sia nel lisato (Fig. 15A) che nel mezzo di coltura (Figure 15B) di entrambe le linee cellulari. Ciò è in accordo con i risultati ottenuti sulla modulazione dell'mRNA di AChE e sull'augmentata attività enzimatica nei lisati dei cheratinociti trattati con captopril. Infatti, la riduzione di ACh è inversamente correlata all'augmentata espressione di AChE.

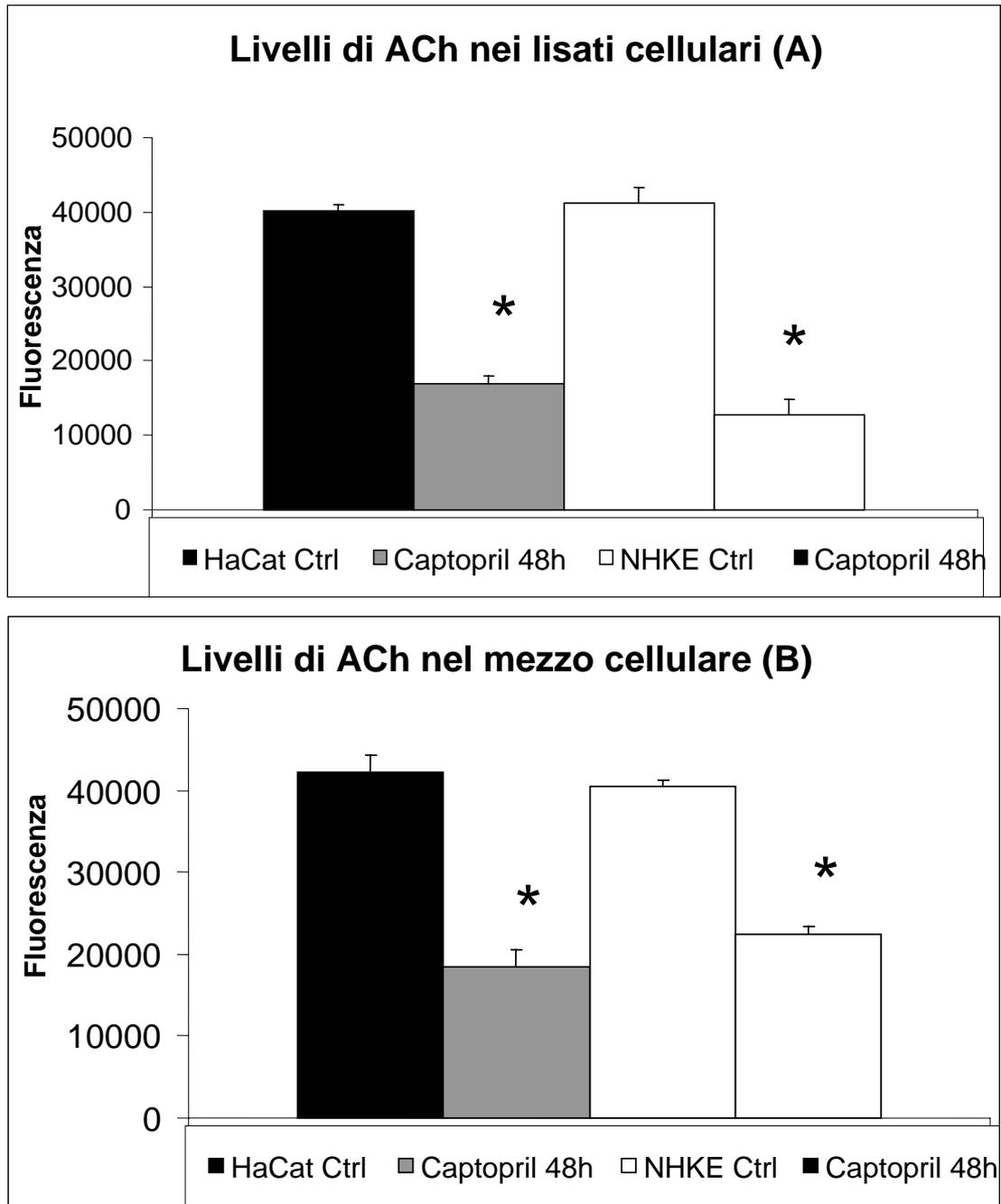


Figura 15. Analisi dei livelli di ACh nei lisati cellulari (A) e nel mezzo di coltura (B) di cellule HaCat e NHEK trattate con captopril usando l' Amplex Red Acetylcholine/Acetylcholinesterase Assay Kit. Le cellule HaCat e NHEK sono state trattate con 15 mM captopril per 48 h. I dati sono presentati come media \pm SD dei risultati di cinque esperimenti indipendenti.

3.3 Effetto del captopril sulle molecole coinvolte nell'adesione cellulare

Per valutare l'effetto della riduzione di ACh sulla coesione cellulare è stata analizzata l'espressione di alcuni geni che sono modulati nelle lesioni acantolitiche tipiche dei pazienti con pemfigo. I risultati, mostrati in Fig. 16 dimostrano che il captopril fortemente riduce la caderina E e la Dsg3, molecole coinvolte nell'adesione cellulare; al contrario, come atteso, la caspasi 3 e MMP9 sono indotte. Infatti, una ridotta espressione di entrambe le classiche caderine desmosomiali, la caderina E e la Dsg3 sono associate ad una riduzione dell'adesione cheratinocitaria e ad una diminuzione del contatto cellula-cellula.

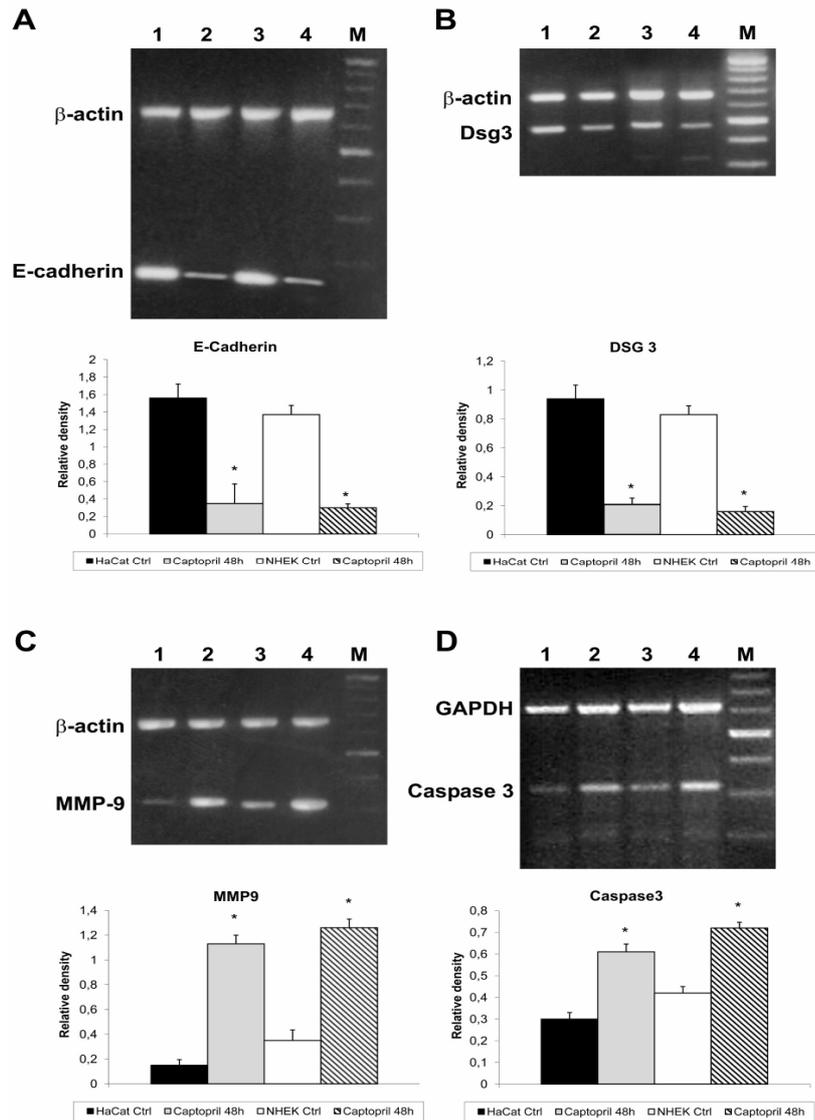


Figure 16. Analisi dei trascritti mediante RT-PCR della caderina E (A), Dsg3 (B), MMP9 (C) e caspasi 3 (D). A) Linea 1: cellule HaCat controllo; linea 2: cellule HaCat trattate con 15 mM captopril (48 h); linea 3: cellule NHKE controllo; linea 4, cellule NHKE trattate con 15 mM captopril (48 h). M, 100 bp ladder MW-marker (Roche Diagnostics). In grafico è rappresentata la misurazione quantitativa dell'intensità delle bande, ottenuta mediante analisi densitometrica utilizzando uno specifico software per analisi delle immagini (NIH image 6.0). I dati mostrati sono rappresentativi di cinque esperimenti \pm SD. * Differenza significativa rispetto al controllo ($P < 0.05$).

3.4 Attivazione di pathway di morte cellulare da parte di acido tannico, allyldimhetylsulfide e ampicillina su cellule HaCat.

Per valutare il possibile coinvolgimento di pathway di morte non apoptotici nell'induzione del pemfigo, abbiamo analizzato se acido tannico, allyldimhetylsulfide e ampicillina fossero in grado di alterare la morfologia di cellule HaCat, mediante esame morfologico. Successivamente, a conferma del pathway attivato, mediante RT-PCR sono stati valutati i geni coinvolti nei differenti processi di morte.

La figura 17 illustra le modifiche morfologiche che avvengono nelle cellule HaCat trattate con acido tannico, allyldimhetylsulfide e ampicillina. In dettaglio, la Fig. 17B dimostra che l'acido tannico induce evidenti modifiche morfologiche e vacuolizzazione citoplasmatica, tipica del pathway di morte autofagico. Inoltre, il trattamento con acido tannico induce anche la riduzione della Dsg3 (Fig. 18A) associato un forte aumento dell'espressione di MMP9 (Fig 18B). Per confermare l'attivazione dell'autofagia da parte dell'acido tannico, sono stati valutati i geni coinvolti in tale pathway. Come mostrato in Fig 19A, nelle cellule trattate si riscontra una forte induzione del gene beclin-1. Infine, per confermare definitivamente l'induzione di un pathway di tipo autofagico è stata analizzata l'espressione delle caspasi. Come mostrato in Fig. 20 nelle cellule trattate con acido tannico non si evidenzia attivazione delle caspasi,

valutabili mediante il kit Multiplex per RT-PCR, mentre risulta evidente l'attivazione di P53. Tali risultati ricondurrebbero all'induzione di un pathway di tipo autofagico per la presenza di una forte espressione di p53, con assenza di frammentazione del DNA (dati non mostrati) e mancata attivazione delle caspasi.

Le figure 17C e 17D, rispettivamente, mostrano le cellule Hacat trattate per 48 ore con allyldimethylsulfide e ampicillina. L'analisi morfologica evidenzia modifiche cellulari tipiche della morte apoptotica, quali perdita di adesione, arrotondamento dei margini cellulari e piccoli blebs di membrana. Dati preliminari molecolari hanno evidenziato sia l'aumento di espressione di Apaf-1 (Fig. 20) che la comparsa di DNA frammentato, tipica espressione dell'induzione di un processo apoptotico (dato non mostrato). Parallelamente la riduzione dell'espressione genica della Dsg3 (Fig. 18A) e l'induzione della MMP9 (Fig. 18B) confermano l'attivazione del pathway apoptotico. Infine, la mancata regolazione dell'espressione genica di beclin-1 (19A) e μ -calpain (Fig. 19B) ha escluso il coinvolgimento di altri pathway di morte cellulare.

A conferma dei pathway di morte cellulari indotti, gli esperimenti sono stati effettuati in presenza di inibitori delle caspasi Z-IETD-FMK e IETD-FMK, inibitori della caspasi 8 e della caspasi 9, rispettivamente. Le cellule sono state pre-trattate con gli inibitori e

successivamente trattate con acido tannico, allyldimetylsulfide e ampicillina. L'effetto del allyldimetylsulfide e ampicillina è stato annullato in presenza degli inibitori delle caspasi, mentre la stessa cosa non si verifica quando le cellule sono trattate con acido tannico (dato non mostrato).

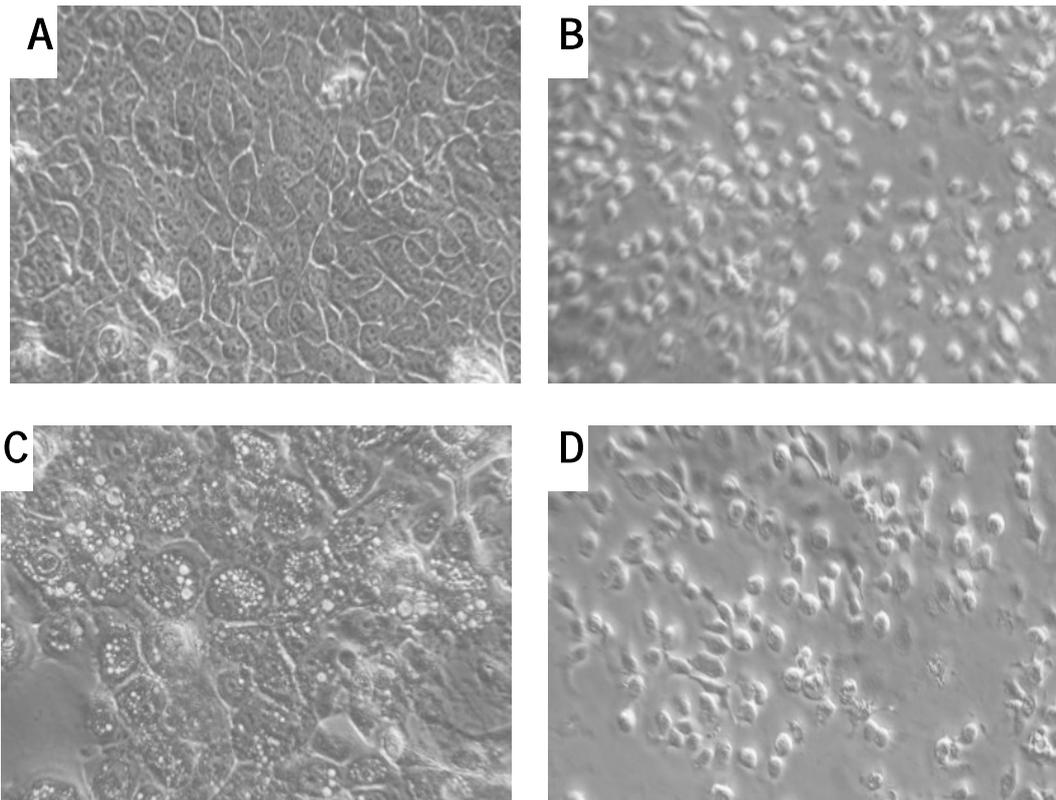


Figura 17. Effetto dell'acido tannico (B), allyldimethylsulfide (C), ampicillina (D) sulla morfologia cellulare di cellule HaCat (microscopio ottico a contrasto di fase). (A) Cellule HaCat controllo (48 h). (B) Cellule HaCat trattate con 15 μ M acido tannico (48 h). (C) Cellule HaCat con 9 mM allyldimethylsulfide (48 h). (D) Cellule HaCat trattate con 100 mM ampicillina (48 h). Ingrandimento: 20 X (B, D); 10 X (A, B).

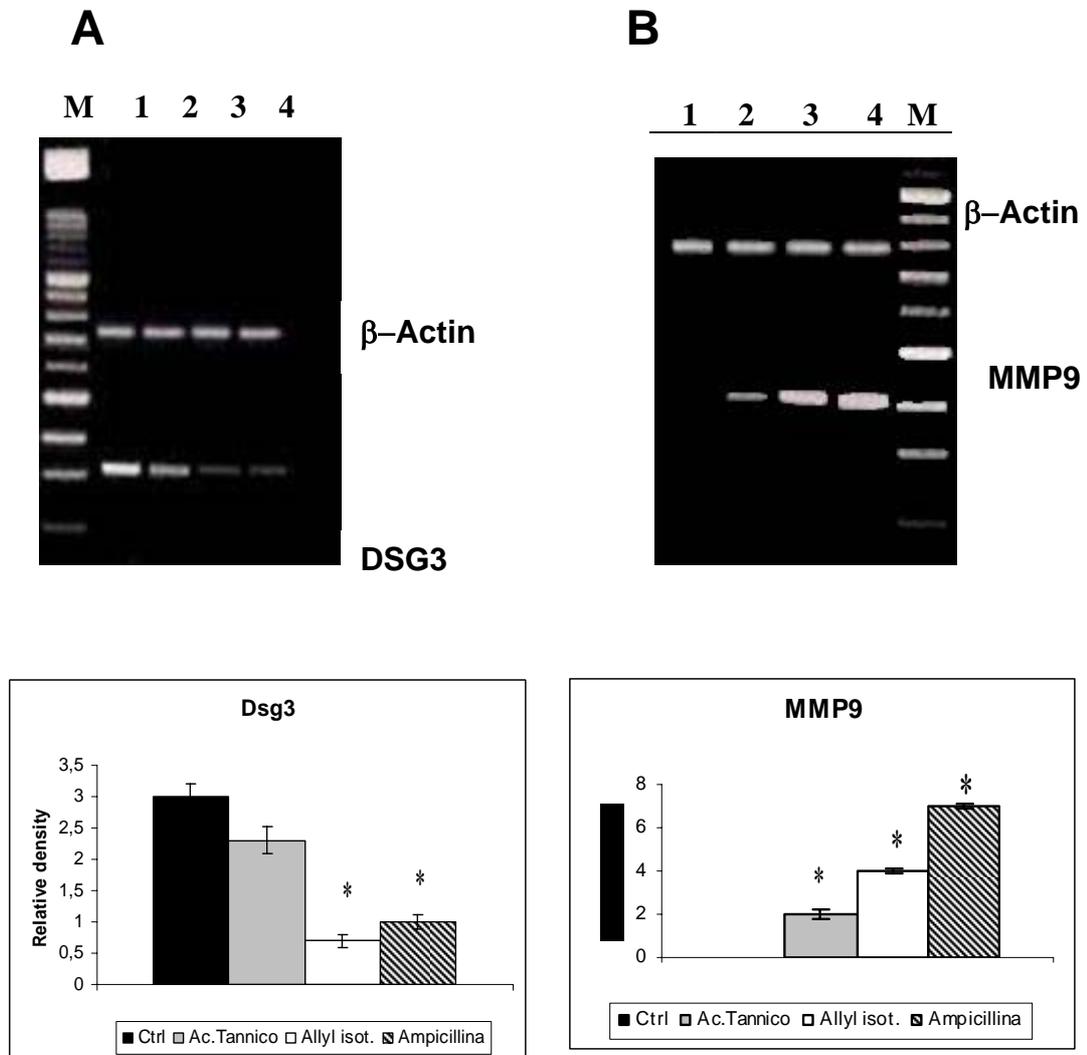


Figure 18. Analisi dei trascritti mediante RT-PCR di DSG3 (A) e MMP9 (B).

Linea 1: cellule HaCat controllo (48 h); linea 2: cellule HaCat trattate con 10 μ M acido tannico (48 h); linea 3: cellule HaCat trattate con 9 mM allyldimetylsulfide (48 h); linea 4, cellule HaCat trattate con 100 mM ampicillina (48 h). M, 100 bp ladder MW-marker (Roche Diagnostics). In grafico è rappresentata la misurazione quantitativa dell'intensità delle bande, ottenuta mediante analisi densitometrica utilizzando uno specifico software per analisi delle immagini (NIH image 6.0). I dati mostrati sono rappresentativi di cinque esperimenti \pm SD. * Differenza significativa rispetto al controllo ($P < 0.05$).

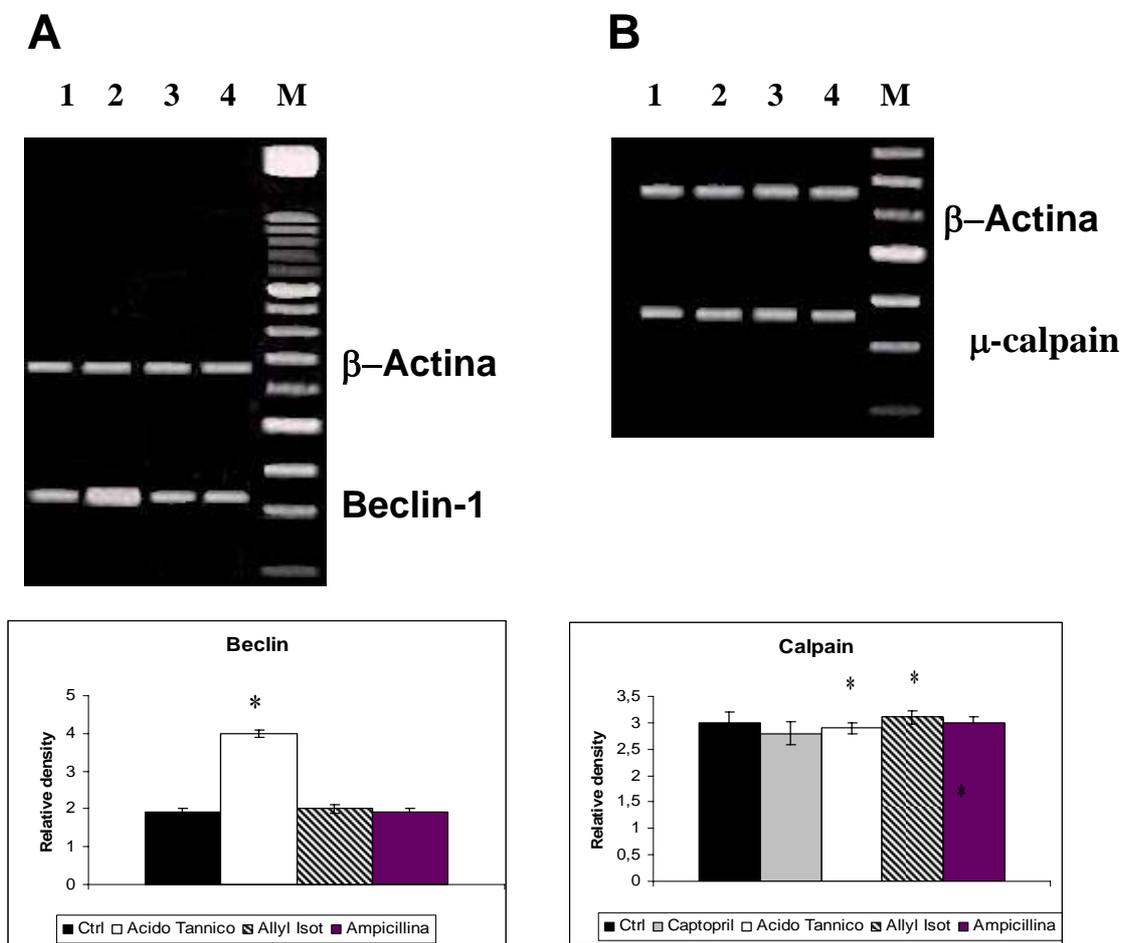


Figure 19. Analisi dei trascritti mediante RT-PCR di beclin-1 (A) e μ -calpain (B). Linea 1: cellule HaCat controllo (48 h); linea 2: cellule HaCat trattate con 10 μ M acido tannico (48 h); linea 3: cellule HaCat trattate con 9 mM allyldimetylsulfide (48 h); linea 4, cellule HaCat trattate con 100 mM ampicillina (48 h). M, 100 bp ladder MW-marker (Roche Diagnostics). In grafico è rappresentata la misurazione quantitativa dell'intensità delle bande, ottenuta mediante analisi densitometrica utilizzando uno specifico software per analisi delle immagini (NIH image 6.0). I dati mostrati sono rappresentativi di cinque esperimenti \pm SD. * Differenza significativa rispetto al controllo ($P < 0.05$).

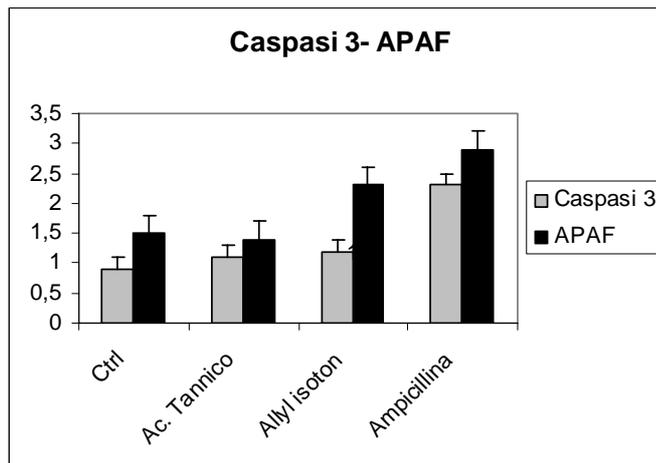
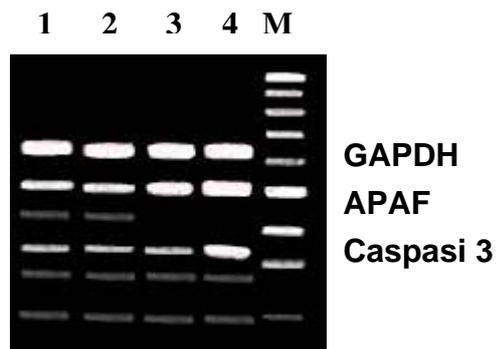


Figure 20. Analisi dei trascritti mediante RT-PCR di caspasi-3. Linea 1: cellule HaCat controllo (48 h); linea 2: cellule HaCat trattate con 10 μ M acido tannico (48 h); linea 2: cellule HaCat trattate con 9 mM allyldimhetylsulfide (48 h); linea 3, cellule HaCat trattate con 100 mM ampicillina (48 h). M, 100 bp ladder MW-marker (Roche Diagnostics). In grafico è rappresentata la misurazione quantitativa dell'intensità delle bande, ottenuta mediante analisi densitometrica utilizzando uno specifico software per analisi delle immagini (NIH image 6.0). I dati mostrati sono rappresentativi di cinque esperimenti \pm SD. * Differenza significativa rispetto al controllo ($P < 0.05$).

4. DISCUSSIONE

In questo lavoro si dimostra che il captopril modula l'attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi, riducendo la concentrazione dell'ACh nei cheratinociti umani. Infatti, il captopril induce una forte riduzione di ACh sia nei lisati cellulari che nel mezzo di coltura dei cheratinociti. Inoltre, il captopril, oltre ad agire a livello dell'acetilcolinesterasi, ha anche effetto sulle molecole responsabili della coesione cellulare. Come si evince dai risultati, una ridotta espressione di entrambe le classiche caderine desmosomiali, la caderina E e la Dsg3, è stata riscontrata in seguito al trattamento; al contrario, come atteso, la caspasi 3 e la metalloproteasi 9 (MMP9) sono indotte. L'attività della caspasi 3 è indicativa dell' induzione dell' apoptosi, ma è anche associata alla degradazione proteolitica della porzione citoplasmatica della caderine desmosomiali. A ciò fa seguito il rilascio delle caderine desmosomiali dalla superficie cellulare ad opera della MMP9 (Weiske *et al.*, 2001). Le metalloproteasi sono una famiglia di endopeptidasi zinco-dipendenti in grado di degradare la matrice della membrana extracellulare (Rolli *et al.*, 2001). Esse hanno un ruolo essenziale nell'angiogenesi tumorale, nella motilità cellulare, nel riparo e nel rimodellamento dei tessuti e delle metastasi (Curran *et al.*, 2000). In particolare, la MMP9, come la MMP2, è una gelatinasi capace di degradare la maggior parte della matrice della membrana extracellulare per formare la membrana basale (Liu *et al.*,

2001). L'effetto stimolatorio dell'ACh nel mediare l'adesione dei cheratinociti può essere riprodotto sia utilizzando agonisti nicotinici che quelli muscarinici. Entrambe le classi di agonisti colinergici possono anche proteggere dall'acantolisi indotta da anticorpi di pemfigo volgare e revertire l'acantolisi prodotta da IgGs. Tali osservazioni suggeriscono che le IgGs agiscono come antagonisti dei recettori dell'ACh impedendo il legame dell'ACh al proprio recettore. Da ciò scaturisce un'alterazione della normale adesione dei cheratinociti e della motilità indotta dal pathway colinergico, con induzione del processo acantolitico.

L'importanza di questi risultati riportati sta nell'abilità di ACh a mediare l'adesione cellulare. L'ACh e i farmaci colinergici possono alterare l'assemblaggio e il disassemblaggio delle giunzioni intercellulari, modificando la forma e la motilità dei cheratinociti in modo autocrino/paracrino (Grando, 2006). Sia gli antagonisti nicotinici che muscarinici causano il distacco cellula-cellula (acantolisi) nel monostrato dei cheratinociti. Al contrario, gli agonisti possono revertire l'acantolisi indotta dagli antagonisti (Grando & Dahl, 1993). ACh rappresenta, così, un importante regolatore autocrino/paracrino dell'adesione e motilità cellulare, e la sua carenza può causare il distacco cellula-cellula. Recenti studi con colinomimetici nel pemfigo, indicano che i farmaci colinergici possono rappresentare un promettente approccio terapeutico per il trattamento di questa

patologia. Si può, allora, ipotizzare in base ai dati ottenuti che, in soggetti geneticamente predisposti, che assumono regolarmente gli ACE inibitori, l'induzione dell'acetilcolinesterasi e la conseguente riduzione dell'acetilcolina può promuovere l'induzione dell'acantolisi e lo sviluppo del pemfigo. Inoltre, l'effetto del captopril potrebbe essere associato all'interferenza dell'ACh nell'adesione cellula-cellula ed alla degradazione delle caderine desmosomiali, con la conseguente acantolisi. In questo contesto, il ruolo giocato dagli autoanticorpi è sempre prominente, ma deve essere rivisto alla luce dei nuovi dati riportati in letteratura. Una recente review riporta un interessante dibattito, in cui per la prima volta, è stato chiesto a diversi autori di rispondere a tale quesito: “sono gli autoanticorpi diretti contro le desmogleine essenziali per l'immunopatogenesi del pemfigo volgare, o semplici testimoni di tale patologia?” (Amagai *et al.*, 2006). Da tale dibattito è emerso che, malgrado le evidenze sperimentali documentino una risposta anti-desmogleine, la sua rilevanza patogenica è ancora da chiarire. Studi recenti dimostrano che oltre alla Dsg1 e Dsg3, i pazienti con PV o PF sviluppano anticorpi contro le molecole di adesione Dsg2 e Dsg4; desmocollina 1, 2 e 3; desmoplachina I e II; placoglobina; collagene XVII; i recettori di membrana, tra cui le subunità dei recettori nicotinici dell'acetilcolina $\alpha 3$ and $\alpha 9$, pemfessina, e altre annessine, Fc ϵ RI α e tiroperossidasi (Amagai *et al.*, 2006). In accordo

con l'ipotesi del "Multiple hit", proposta da Grando, solo una certa costellazione di anticorpi patogenici che lavorano simultaneamente in maniera sinergica, può alterare la difesa cheratinocitaria e distruggere i contatti cellula-cellula. L'eliminazione di uno degli anticorpi può interrompere l'attacco (Grando, 2000). Questa ipotesi riconcilia recenti scoperte sull'autoimmunità dei recettori anti-acetilcolina nel pemfigo al fatto che anche i pazienti con pemfigo sviluppano autoanticorpi per le molecole di adesione. L'acantolisi può allora, risultare dal sinergico e cumulativo effetto di autoanticorpi rivolti verso antigeni della membrana cheratinocitaria, incluso quelli che regolano la forma e l'adesione cellulare (AChR), e le molecole che mediano l'adesione cellula-cellula (caderine desmosomiali). La severità della patologia e il quadro clinico potrebbero dipendere dalla quantità di autoanticorpi prodotti da ciascun paziente. Di grande interesse sono i dati che evidenziano la presenza di autoanticorpi non patogenici in parenti sani di pazienti affetti da pemfigo (Torzgercha *et al.*, 2003). Perché in questi soggetti in cui è stata dimostrata la produzione di autoanticorpi, non ci sono manifestazioni cliniche della patologia? Si potrebbe postulare l'intervento di fattori esterni, che in soggetti geneticamente predisposti, inducono una perturbazione dell'omeostasi cellulare, incluso uno sbilancio tra la quantità di ACh libera e anticorpi patogenici. In questi individui che producono anticorpi non patogenici per il

pemfigo, l'uso del captopril potrebbe indurre una riduzione di ACh libera, rendendo così disponibili i recettori dell'ACh per il legame degli autoanticorpi. In tal modo, l'ACh non può regolare l'adesione dei cheratinociti, mentre gli autoanticorpi possono legare e saturare il loro target. Come proposto da Grando, la cascata di eventi inducenti l'acantolisi è così attivata (Grando, 2006).

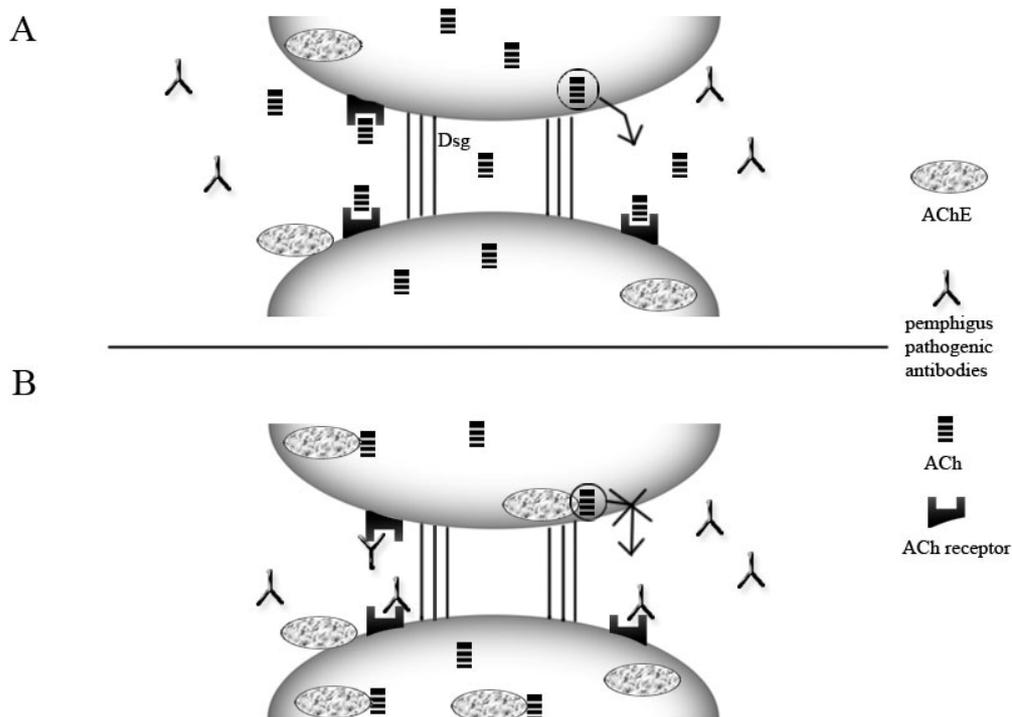


Figure 6. Rappresentazione schematica degli eventi patobiologici attivati nel pemfigo indotto dal captopril. (A) Soggetti che non manifestano clinicamente il pemfigo, ma che producono gli anticorpi non-patogenetici del pemfigo. **(B)** Pazienti con pemfigo indotto da captopril. I livelli alterati di AChE riducono fortemente i livelli di Ach libera, allora favoriscono il legame degli autoanticorpi disponibili al recettore dell' ACh. Gli autoanticorpi patogenetici possono saturare il loro target e indurre l'acantolisi.

E' interessante riportare che l'agonista colinergico mestinone fa aumentare i livelli di ACh endogena nei tessuti, perché inibisce in modo reversibile l'AChE. Inoltre, il mestinone può interagire con il complesso dei canali ionici dell'ACh, bloccandoli in una conformazione aperta. Da ciò consegue che la stimolazione dell'asse dell'acetilcolina da parte del mestinone può determinare un effetto terapeutico nel pemfigo, in quanto stimola il contatto cellula-cellula, promuovendo la riepitelizzazione. Il mestinone, mediante una competizione biochimica con gli autoanticorpi del pemfigo, impedisce il loro legame ai recettori dell'acetilcolina ai cheratinociti (Grando, 2004). Anche la nicotinammide ha effetti colinomimetici dovuti sia alla stimolazione del rilascio di ACh, che all'inibizione di AChE (Grando, 2006).

I risultati qui discussi mettono in evidenza il ruolo svolto sia dalla predisposizione genetica che dai possibili fattori ambientali o molecole in grado di scatenare il pemfigo. I fattori esterni potrebbero contribuire all'insorgenza del pemfigo alterando i livelli di ACh, ma anche attivando i geni coinvolti nel pathway della morte programmata cellulare. E' importante ricordare che eventi stressanti determinano il rilascio di grandi quantità di catecolamine, che inducono uno squilibrio tra il sistema colinergico e quello adrenergico nel corpo umano; ciò

potrebbe essere sufficiente a provocare lo sviluppo del PV per la carenza di ACh (Grando *et al.*, 2006).

In conclusione, nel pemfigo indotto dagli ACE-inibitori, l'acantolisi potrebbe essere associata ad alterati livelli di ACh e all'induzione dell'apoptosi. Per quanto riguarda gli autoanticorpi, essi potrebbero non avere più un ruolo principale, ma solo partecipare all'induzione della malattia in soggetti predisposti in seguito all'intervento di fattori scatenanti.

Infine, i dati mostrati in questa prima fase del lavoro potrebbero ulteriormente stimolare la ricerca in questo intrigante, ma affascinante campo dell'autoimmunità della cute. La prima parte del progetto di tesi qui discusso è stato inviato alla rivista *J Invest Dermatol*.

Nella seconda fase del progetto di tesi, è stata valutata anche la capacità di fattori scatenanti il pemfigo, quali acido tannico, allyldimethylsulfide e ampicillina di indurre apoptosi o pathway di morte cellulare alternativi in cheratinociti umani.

L'acido tannico induce evidenti modifiche morfologiche e vacuolizzazione citoplasmatica, tipiche del pathway di morte autofagico. Tali dati sarebbero confermati da una forte induzione del gene beclin-1 e da una forte espressione di p53. Dati recenti in letteratura sembrerebbero indicare, infatti, p53 come un gene in grado di controllare anche l'autofagia. A conferma di tali risultati c'è anche il

dato sulla mancata attivazione delle caspasi. Infatti, è noto che l'autofagia non richiede l'attivazione delle caspasi, essendo, al contrario dell'apoptosi, un meccanismo caspasi-indipendente. Infine, la mancata regolazione dell'espressione genica di μ -calpain ha escluso il coinvolgimento della necrosi programmata nelle cellule trattate con acido tannico. Tali studi sarebbero avvalorati anche dagli esperimenti effettuati in presenza di inibitori della caspasi 8 e della caspasi 9, che non bloccano l'effetto dell'acido tannico sulle cellule HaCat.

Il trattamento dei cheratinociti primari con allyl isothiocyanate e ampicillina ha evidenziato l'induzione di Apaf-1 che ricondurrebbe all'attivazione di un pathway apoptotico di tipo mitocondriale. L'attivazione del processo apoptotico è stata confermata dalla presenza di DNA frammentato e dall'analisi morfologica che evidenzia modifiche cellulari tipiche della morte apoptotica quali perdita di adesione, arrotondamento dei margini cellulari e piccoli blebs di membrana. Inoltre, è stata riscontrata una riduzione della Dsg3 associata ad aumento di MMP9. La mancata regolazione dell'espressione genica di μ -calpain (Fig. 19B) e beclin-1 (19A) ha escluso il coinvolgimento di altri pathway di morte cellulare nelle cellule trattate con allyl isothiocyanate e ampicillina.

Infine, a conferma dei pathway di morte cellulari indotti, gli esperimenti sono stati effettuati in presenza di inibitori della caspasi 8 e

della caspasi 9. L'effetto dell'allyldimethylsulfide e ampicillina viene annullato in presenza degli inibitori delle caspasi, al contrario delle cellule trattate con acido tannico.

Gli studi sui pathway di morte cellulare indotti da acido tannico, allyl isothiocyanate e ampicillina su cellule HaCat andranno riconfermati con ulteriori esperimenti.

Sebbene, non sia sempre facile dimostrare una diretta associazione tra fattori inducenti e pemfigo, potrebbe essere molto interessante continuare con tali studi per dimostrare la loro abilità ad indurre la morte cellulare. In un pemfigo indotto da farmaci potrebbe essere attivato un programma di morte diverso da un pemfigo indotto da radiazioni, in quanto, diversi sono gli effettori e differenti potrebbero essere le modalità attraverso cui viene attivata la morte cellulare. Questo rende necessario un'attenta analisi dei diversi casi di pemfigo differenzialmente indotti, allo scopo di verificare la possibilità di adoperare la stessa o diversa strategia terapeutica. Questi studi sperimentali potrebbero consentire lo sviluppo di modalità terapeutiche mirate, che potrebbero essere associate ai glucocorticosteroidi, per ridurre le concentrazioni e quindi gli effetti collaterali, tenendo conto oltre alla storia del paziente, del fattore scatenante la malattia, e soprattutto del pathway molecolare da esso attivato.

In conclusione, il pemfigo potrebbe essere associato all'induzione dell'apoptosi, o altri meccanismi di morte cellulare programmata, responsabili delle drastiche manifestazioni acantolitiche. Ulteriori esperimenti si stanno effettuando per studiare altre molecole induttrici di pemfigo e per approfondire i risultati sopra riportati, allo scopo di conoscere il pathway molecolare alla base dei meccanismi di azione di tali sostanze.

BIBLIOGRAFIA

- Adams JM and Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326.
- Amagai M, Ahmed AR, Kitajama Y, Brystryn JC, Milner Y, Gniadecki R *et al.* (2006) Are desmoglein autoantibodies essential for the immunopathogenesis of pemphigus vulgaris, or just witnesses of disease? *Exp Dermatol* 15: 815-831.
- Arredondo J, Chernyavsky AI, Karaouni A, Grando SA (2005) Novel mechanisms of target cell death and survival and of therapeutic action of IVIg in pemphigus. *Am J Pathol* 167: 1531.
- Baroni A, Buommino E, Paoletti I, Orlando M, Ruocco E, Ruocco V (2004) Pemphigus serum and captopril induce hsp 70 and inducible nitric oxide synthase overexpression, triggering apoptosis in human keratinocytes. *Br J Dermatol* 150: 1070-1080.
- Boyce ST & Ham RG (1983) Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* 81: 33-40.
- Brenner S, Wolf R, Ruocco V (1994) Contact pemphigus: a subgroup of induced pemphigus. *Int J Dermatol* 33: 843-845.

- Contassot E, Gaide O, French LE (2007) Death receptors and apoptosis. *Dermatol Clin* 25: 487-501.
- Cryns V, Yuan J (1998) Proteases to die for (1998) *Genes Dev* 12: 1551.
- Curran S, Murray GI (2000) Matrix metalloproteinases: Molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36: 1621-1630.
- Danial NN & Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219.
- Duke RC, Ocjcius DM and Ding-E Young J (1996). Cell Suicide in Health and disease. *Scientific American*: 48-55.
- Edinger AL, Thompson CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy *Current Opinion in Cell Biology* 16: 663-669.
- Gervais FG, Xu D, Robertson GS et al (1999) Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation. *Cell* 97: 395-406.
- Gozuacik D & Kimchi A (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23: 2891-2906.
- Grando SA (2004) New approaches to the treatment of pemphigus. *J Investig Dermatol Symp Proc* 9: 84-91.

- Grando SA (2006) Cholinergic control of epidermal cohesion. *Exp Dermatol* 15: 265-282.
- Grando SA and Dahl MV (1993) Activation of keratinocytes muscarinic acetylcholine receptors reverses pemphigus acantholysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2: 72-86.
- Grando SA and De Angelis M (2000). Autoimmunity to keratinocyte acetylcholine receptors in pemphigus. *Dermatology* 201: 290-295.
- Grando SA, Pittelkow MR, Schallreuter KU (2006) Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance. *J Invest Dermatol* 126: 1948-1965.
- Hetts SW (1998) To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in diseases. *JAMA* 279: 300-307.
- Kurzen H, Wessler I, Kirkpatrick CJ, Kawashima K, Grando SA (2007) The non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res* 39: 125-135.
- Lanza A, Cirillo N, Femiano F and Gombos F (2006) How does acantholysis occur in pemphigus vulgaris: a critical review. *J Cutan Pathol* 33: 401-412.
- Liu Z, Ivanoff A, Klominek J (2001) Expression and activity of matrix metalloproteases in human malignant mesothelioma cell

lines. *Int J Cancer* 91: 638-643.

- Majno G, Joris I (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146: 3-15.
- Moroy T and Zornig M (1996) Regulators of life and Death: The Bcl-2 Gene Family. *Cellular Physiology and Biochemistry* 6: 312-336.
- Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differ* 6: 1028-1042.
- Ona VO, Li M, Vonsattel JP, Andrews LJ et al (1999) Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 399: 263-267.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122: 927-939.
- Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 283: 1-16.
- Quattrone A. & Capaccioli S (1995) I geni della morte cellulare programmata. *Le Scienze edizione italiana di Scientific American* 326: 42-50.

- Raff MC, Barres BA, Burne JF et al (1993) Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262: 695-700.
- Rolli M, Fransvea E, Pilch J, Saven A, Felding-Habermann B (2003) Activated integrin $\alpha v \beta 3$ cooperates with metalloproteinase MMP9 in regulating migration of metastatic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 9482–9487.
- Ruocco V and Ruocco E (2003) Pemphigus and environmental factors. *G Ital Dermatol Venereol* 138: 299-309.
- Ruocco V, Brenner S, Lombardi ML (1996) A case of diet-related pemphigus. *Dermatology* 192: 373-374.
- Ruocco V, Brenner S, Ruocco E et al (1998) Different patterns of in vitro acantholysis in normal human skin samples explanted from different sites of the body. *Int J Dermatol* 37: 18-22.
- Svendsen M L, Daneels G, Geysen J, Binderup L, Kragballe K (1997) Proliferation and differentiation of cultured human keratinocytes is modulated by 1.25(OH)₂D₃ and synthetic vitamin D₃ analogues in a cell density-, calcium- and serum-dependent manner. *Pharmacol Toxicol*: 80: 49–56.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 28: 1312-1316.

- Torzercka JD, Narbutt J, Sysa-Jedrzejowska A, Waszczykowska E, Lukamowicz, Pas HH (2003) Detection of pemphigus autoantibodies by IIF and ELISA tests in patients with pemphigus vulgaris and foliaceus and in healthy relatives. *Med Sci Monit* 9: 528-533.
- Vaux DL et al. (1999) Caspases and apoptosis-biology and terminology. *Cell Death Differentiation* 6: 493-507.
- Wang X, Bregegere F, Frusic-Zlotkin M, Feinmesser M, Michel B, Milner Y (2004) Possible apoptotic mechanism in epidermal cell acantholysis induced by pemphigus vulgaris autoimmunoglobulins. *Apoptosis* 9: 131–43.
- Weiske J, Schoneberg T, Schroder W, Hatzfeld M, Tauber R, Huber O (2001) The fate of desmosomal proteins in apoptotic cells. *J Biol Chem* 276: 41175-41181.