

**Alma Mater Studiorum**  
**Università degli Studi di Bologna**

---

**DOTTORATO DI RICERCA**  
**IN**  
**EMATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE**

XIX ciclo  
Settore Scientifico Disciplinare: MED/15

Coordinatore del Corso di Dottorato: Prof. Stefano Pileri

*Istituto di Ematologia ed Oncologia Medica “L. & A. Seràgnoli”*  
*Direttore: Prof. Michele Baccharani*

**IL NUCLEOTIDE EXTRACELLULARE UTP:**  
**INDUZIONE DELLA MIGRAZIONE DI**  
**CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE CD34<sup>+</sup>**

Relatore:

Dott.ssa  
**LUCIA CATANI**

Correlatore:

Prof.  
**ROBERTO M. LEMOLI**

Presentata da:

Dott.ssa  
**LARA ROSSI**

*Anno Accademico 2006/2007*

---

---

# INDICE

---

<b>SOMMARIO</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>7</b>
<b>I. BIOLOGIA DELLE CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE</b>	<b>7</b>
1. Modelli di struttura del sistema emopoietico	8
2. Compartimentalizzazione della staminalità nel sistema emopoietico	9
3. La popolazione staminale emopoietica	12
<b>II. REGOLAZIONE DEL SISTEMA EMOPOIETICO</b>	<b>15</b>
1. Il concetto di “nicchia”	15
2. Caratteristiche biomolecolari dell’interfaccia cellula staminale-nicchia.	17

Lara Rossi – Nucleotidi extracellulari e migrazione di cellule staminali emopoietiche	2
<b>III. MIGRAZIONE CELLULARE</b>	<b>19</b>
1. Principi dinamici della migrazione cellulare.	20
2. Meccanismi di migrazione e polarizzazione cellulare.	22
3. Il <i>network</i> chemochinico	23
4. I recettori chemochinici	25
<b>IV. I FENOMENI DI MIGRAZIONE ALL'INTERNO DEL SISTEMA EMOPOEITICO</b>	
<b><i>Mobilizzazione, Homing e Attecchimento di Cellule Staminali Emopoietiche</i></b>	<b>23</b>
1. VLA-4 ed altre integrine	30
2. Interazione tra CD44 ed Acido Ialuronico	30
3. Interazione tra c-kit e SCF	31
4. Il ruolo delle proteasi	31
5. Interazione tra CXCR4 e CXCL12	32
<i>Interazione CXCL12/CXCR4 tra cellule emopoietiche e cellule stromali nell'ambiente midollare: ritenzione dei progenitori emopoietici a livello midollare.</i>	33
<i>Interazione CXCL12/CXCR4 tra cellule emopoietiche e cellule stromali nell'ambiente midollare: mobilizzazione di progenitori emopoietici.</i>	34
<b>V. LA FAMIGLIA DELLE Rho GTPasi</b>	<b>37</b>
1. Il ruolo delle Rho GTPasi nella regolazione del traffico di cellule staminali emopoietiche: homing, ritenzione e migrazione.	38
<b>VI. BIOLOGIA DEI NUCLEOTIDI EXTRACELLULARI</b>	<b>40</b>
1. Sorgenti di nucleotidi extracellulari	40
2. Metabolismo dei nucleotidi extracellulari	42
<b>VII. NUCLEOTIDI EXTRACELLULARI E RECETTORI P2</b>	<b>43</b>

Lara Rossi – Nucleotidi extracellulari e migrazione di cellule staminali emopoietiche	3
1. Recettori P2X	44
2. Recettori P2X: ruoli fisiologici	46
3. Recettori P2Y	47
4. Recettori P2Y: proprietà funzionali.	48
<b>VIII. NUCLEOTIDI EXTRACELLULARI E SISTEMA EMOPOIETICO</b>	<b>50</b>
1. Recettori P2 e modulazione di processi proliferativi e differenziativi	51
2. Recettori P2 ed effetti citotossici	52
3. Recettori P2 nei processi flogistici ed immunitari.	53
<b>IX. TRASDUZIONE DEL SEGNALE ATTIVATO DA RECETTORI P2</b>	<b>54</b>
<b>X. NUCLEOTIDI EXTRACELLULARI E MIGRAZIONE CELLULARE</b>	<b>57</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>74</b>
1. Saggi di migrazione in vitro: il trattamento con UTP incrementa la risposta chemiotattica di cellule staminali emopoietiche umane verso gradienti di CXCL12.	74
2. Ruolo del recettore CXCR4 nella risposta migratoria attivata dal nucleotide UTP.	80
3. Mobilizzazione intracellulare di ioni calcio.	83
4. Polimerizzazione intracellulare dei filamenti di fibronectina.	84
5. Saggio di adesione.	85
6. Saggi di homing competitivo in vivo in topi NOD/SCID.	87
7. Analisi del profilo trascrizionale di cellule umane CD34 <sup>+</sup> in seguito a trattamento con UTP e CXCL12.	90
8. La cascata di trasduzione del segnale delle Rho GTPasi.	104
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>108</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>120</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>132</b>

---

## SOMMARIO

---

La letteratura scientifica degli ultimi anni si è arricchita di un numero sempre crescente di studi volti a chiarire i meccanismi che presiedono ai processi di *homing* di cellule staminali emopoietiche e del loro attecchimento a lungo termine nel midollo osseo.

Tali fenomeni sembrano coinvolgere da un lato, l'interazione delle cellule staminali emopoietiche con la complessa architettura e componente cellulare midollare, e dall'altro la risposta ad un'ampia gamma di molecole regolatrici, tra le quali chemochine, citochine, molecole di adesione, enzimi proteolitici e mediatori non peptidici. Fanno parte di quest'ultimo gruppo anche i nucleotidi extracellulari, un gruppo di molecole-segnale recentemente caratterizzate come mediatori di numerose risposte biologiche, tra le quali l'allestimento di fenomeni flogistici e chemiotattici.

Nel presente studio è stata investigata la capacità dei nucleotidi extracellulari ATP ed UTP di promuovere, in associazione alla chemochina CXCL12, la migrazione di cellule staminali umane CD34<sup>+</sup>.

E' così emerso che la stimolazione con UTP è in grado di incrementare significativamente la migrazione dei progenitori emopoietici in risposta al gradiente chemioattrattivo di CXCL12, nonché la loro capacità adesiva. Le analisi citofluorimetriche condotte su cellule migranti sembrano inoltre suggerire che l'UTP agisca interferendo con le dinamiche di internalizzazione del recettore CXCR4, rendendo così le cellule CD34<sup>+</sup> maggiormente responsive, e per tempi più lunghi, al gradiente attrattivo del CXCL12.

Saggi di *homing* competitivo *in vivo* hanno parallelamente mostrato, in topi NOD/SCID, che la stimolazione con UTP aumenta significativamente la capacità dei progenitori emopoietici umani di localizzarsi a livello midollare.

Sono state inoltre indagate alcune possibili vie di trasduzione del segnale attivate dalla stimolazione di recettori P2Y con UTP. Esperimenti di inibizione in presenza della tossina della Pertosse hanno evidenziato il coinvolgimento di proteine G<sub>zi</sub> nella migrazione dipendente da CXCL12 ed UTP.

Ulteriori indicazioni sono provenute dall'analisi del profilo trascrizionale di cellule staminali CD34<sup>+</sup> stimulate con UTP, con CXCL12 o con entrambi i fattori contemporaneamente. Da questa analisi è emerso il ruolo di proteine della famiglia delle Rho GTPasi e di loro effettori a valle (ROCK 1 e ROCK 2) nel promuovere la migrazione UTP-dipendente. Questi dati sono stati confermati successivamente *in vitro* mediante esperimenti con Tossina B di *C. Difficile* (un inibitore delle Rho GTPasi) e con Y27632 (in grado di inibire specificatamente le cinasi ROCK).

Nel complesso, i dati emersi in questo studio dimostrano la capacità del nucleotide extracellulare UTP di modulare la migrazione *in vitro* di progenitori emopoietici umani, nonché il loro *homing* midollare *in vivo*. L'effetto dell'UTP su questi fenomeni si esplica in concerto con la chemochina CXCL12, attraverso l'attivazione concertata di vie di trasduzione del segnale almeno parzialmente condivise da CXCR4 e recettori P2Y e attraverso il reclutamento

comune di proteine ad attività GTPasica, tra le quali le proteine  $G_{\alpha i}$  e i membri della famiglia delle Rho GTPasi.

---

# INTRODUZIONE

---

## I. BIOLOGIA DELLE CELLULE STAMINALI EMOPOIETICHE

Il processo sequenziale attraverso il quale una popolazione di cellule staminali dà origine a tutte le filiere differenziative ematiche viene definito emopoiesi. Le cellule staminali emopoietiche si caratterizzano principalmente per la capacità di ricostituire per intero il sistema emopoietico di ospiti irradiati letalmente, grazie al potenziale di auto-rinnovamento e di multipotenzialità che le caratterizza (1). Oltre a queste caratteristiche, è recentemente emersa come proprietà funzionale fondamentale per le cellule staminali emopoietiche la capacità di migrare direzionalmente verso gradienti chemotattici. La capacità migratoria e il potenziale di ripopolamento sono strettamente inter-dipendenti, come dimostrato da esperimenti con progenitori emopoietici isolati da embrioni murini: l'assenza di migrazione



direzionale preclude la possibilità di ottenere un trapianto a lungo termine e, quindi, di salvare il ricevente che sia stato sottoposto ad irradiazione (2).

Durante la vita fetale, il fegato rappresenta il principale sito emopoietico, mentre durante la vita adulta, il sito elettivo di emopoiesi diviene il midollo osseo. I processi proliferativi e differenziativi che garantiscono il mantenimento del sistema emopoietico, come verrà discusso in dettaglio di seguito, dipendono strettamente dal microambiente midollare, caratterizzato dalla presenza di numerosi istotipi cellulari, che interagiscono tra di loro nel generare la particolare architettura tridimensionale e il peculiare *milieu* citochinico che fanno da cornice alle varie fasi di questo processo (3).

## 1. Modelli di struttura del sistema emopoietico

I meccanismi alla base della regolazione del sistema emopoietico sono ancora oggetto di dibattito e vedono opporsi due principali scuole di pensiero: una a favore di un modello di regolazione squisitamente stocastica e, la seconda, basata su una visione più deterministica del processo che porta alla generazione delle diverse filiere emopoietiche.

Il **modello stocastico** è stato per la prima volta formulato da Till, McCulloch e Siminovitch, i quali pubblicarono nel 1940 l'ipotesi in base alla quale i processi di proliferazione e *turnover* della popolazione staminale sono guidati da fenomeni stocastici e probabilistici. Pertanto, ogni cellula si può pensare caratterizzata da un certo valore di probabilità statistica di andare incontro ad auto-rinnovamento o differenziamento.

Tale modello è stato successivamente rielaborato ed ampliato da Ogawa (4) nell'ipotesi che, all'interno dell'emopoiesi si possano distinguere diverse gerarchie di staminalità, caratterizzate da cellule con diverso potenziale di autorinnovamento. Questo nuovo modello prevede inoltre la possibilità che fattori umorali (quali i fattori di crescita emopoietici) possano influire sul destino differenziativo delle cellule staminali o, in termini statistici, possano modulare la curva

di distribuzione delle probabilità di una cellula di acquisire, ad esempio, un fenotipo mieloide, piuttosto che linfoide.

Parlando di **modello deterministico**, si fa in realtà riferimento a due modelli distinti. Il modello del **potenziale predeterminato** vede nel differenziamento staminale un fenomeno programmato a priori a livello genetico. Il destino, cui una cellula staminale andrà incontro una volta abbandonata la “nicchia” midollare, sarebbe pertanto prevedibile e l’azione di fattori di crescita ed altre citochine sarebbe limitata al controllo del ciclo cellulare o della sopravvivenza. In quest’ottica, i fattori umorali, pur perdendo il potere di guidare la direzione della via differenziativa, aggiungerebbero flessibilità alle risposte biologiche di cellule il cui destino è tuttavia in gran parte già deciso. Il modello del **controllo extracellulare** suggerisce al contrario che il destino delle cellule staminali sia *determinato* principalmente dall’effetto induttivo del microambiente midollare, vale a dire dal peculiare *milieu* citochinico in cui le cellule si vengono a trovare durante il loro sviluppo.

Qualunque sia la teoria che meglio descrive il destino delle cellule staminali emopoietiche, è tuttavia bene ricordare che entrambe le scuole di pensiero si basano sui concetti fondamentali di auto-rinnovamento e potenziale differenziativo, che sono alla base dell’organizzazione gerarchica (o “piramidale”) dell’emopoiesi (Figura 1). Al vertice di questa piramide si trova una ristretta popolazione di cellule primitive, con caratteristiche di auto-rinnovamento e multipotenzialità, da cui si dipartono compartimenti sequenziali all’interno della gerarchia emopoietica. Tali compartimenti si caratterizzano per la progressiva perdita di potenziale auto-replicativo, accompagnata da un aumento consensuale della specificità differenziativa.

## 2. Compartimentalizzazione della staminalità nel sistema emopoietico

Sebbene la diversità funzionale dei progenitori emopoietici sia stata ormai appurata, rimangono invece poco chiari i meccanismi attraverso cui tale variabilità si genera nel sistema emopoietico.

Il modello attualmente più accettato vuole che l'eterogeneità del compartimento staminale sia il risultato dell'integrazione di segnali *intrinseci* ed *estrinseci*.

Per **fattori estrinseci** si intendono prevalentemente stimoli ambientali (quali fattori umorali, chemochine, molecole di adesione e fattori di crescita), prodotti dallo stroma midollare per generare il *milieu* della “nicchia” staminale. In quest'ottica, la localizzazione di cellule staminali in “nicchie” di diversa composizione citochinica sarebbe, ad esempio, un meccanismo in grado di generare di per sé eterogeneità nella popolazione staminale.

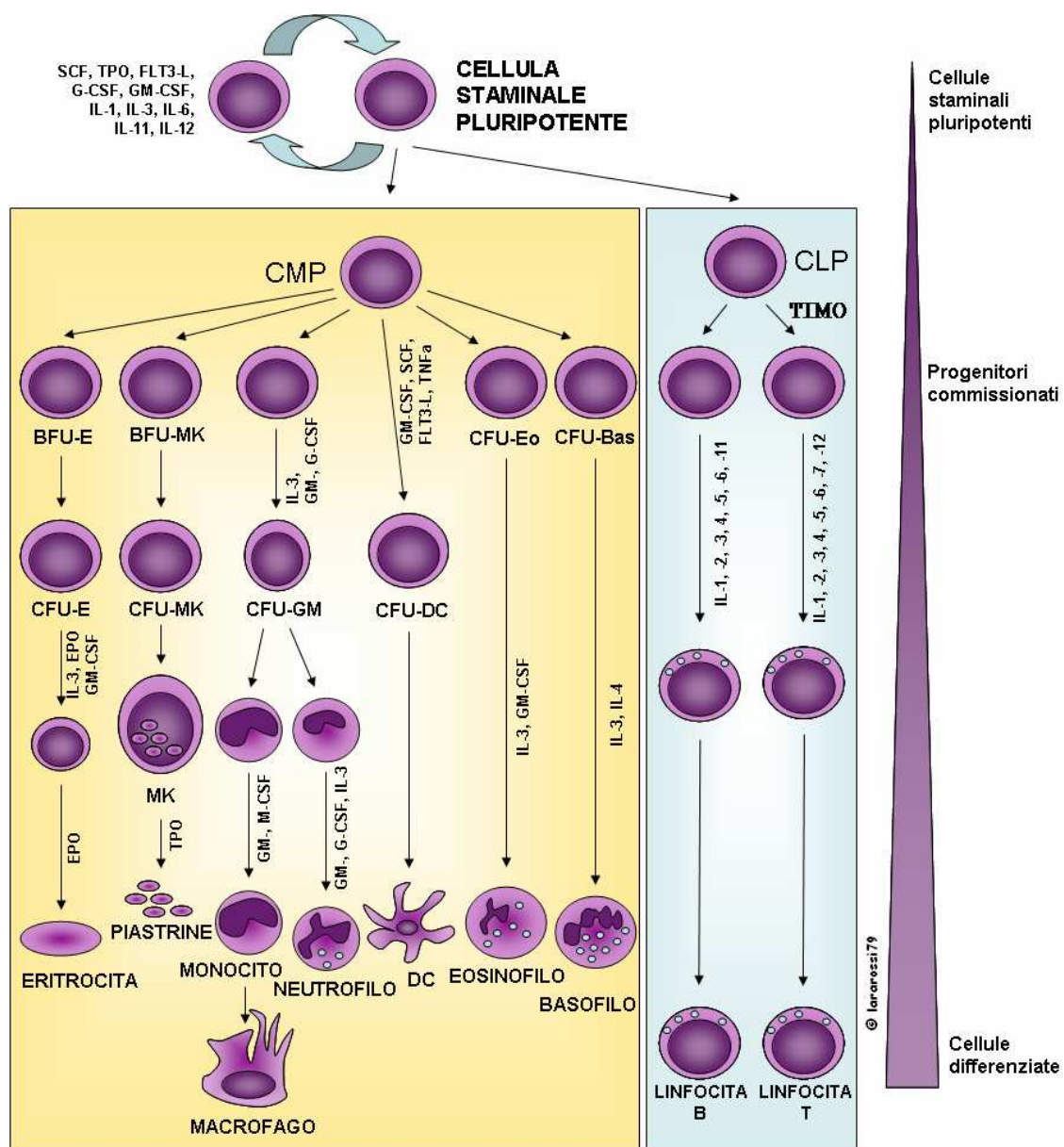


Figura 1. Schema rappresentativo del sistema emopoietico e della sua caratteristica struttura ad “albero”.

In aggiunta a tali fattori estrinseci, vi sono poi *meccanismi intrinseci* alla cellula staminale stessa, in grado di generare variabilità attraverso diversi programmi genici, generati in modo casuale, ad ogni divisione cellulare. Ad esempio, ogni cellula può, ad ogni momento, decidere tra diversi destini: auto-rinnovamento, differenziamento, apoptosi o migrazione.

Nel corso degli ultimi anni sono emerse tuttavia evidenze della “non”-casualità di tali decisioni: vale a dire, che la genesi di questi fattori intrinseci potrebbe non essere totalmente stocastica, come ritenuto in passato, ma che essi siano (almeno in parte) frutto di una programmazione a priori. Ad esempio, le dimensioni del compartimento staminale e la sua evoluzione nel corso dell’invecchiamento sembrano dipendere da meccanismi intrinseci, determinati già a livello germinale. Se così, alcuni dei meccanismi di regolazione intrinseca costituirebbero un limite alla generazione incontrollata di eterogeneità, predeterminando a priori un numero ristretto di destini evolutivi possibili (5, 6).

L’idea che il compartimento staminale sia regolato da fattori estrinseci ed intrinseci generati stocasticamente rende plausibile l’ipotesi formulata da Quesenberry (7), secondo la quale la generazione di eterogeneità sia un *continuum* di stati intermedi non prevedibili a priori.

A questa visione si oppone tuttavia l’idea che il destino delle cellule staminali sia in gran parte pre-determinato, come sembrano indicare gli studi pubblicati dal gruppo di Sieburg (5, 6, 7).

Ovunque risieda il “vero” modello dell’emopoiesi, è plausibile pensare che fattori di crescita, chemochine e molecole di adesione giochino un ruolo importante nella modulazione delle funzioni staminali, sia *in vivo* che *ex-vivo*.

Rimane perciò di fondamentale importanza poter identificare nuovi fattori umorali coinvolti nella generazione di un *milieu* in grado di guidare le cellule staminali verso l’auto-rinnovamento, il differenziamento terminale o la migrazione verso diversi microambienti.

### 3. La popolazione staminale emopoietica

Le cellule staminali emopoietiche presenti a livello midollare sono estremamente rare (1 su 10,000 – 100,000 cellule); inoltre, la morfologia tipica di cellule immature ed indifferenziate ne rende particolarmente difficile l'isolamento. Soltanto grazie all'analisi combinata di caratteristiche immunofenotipiche e funzionali è stata possibile, negli ultimi anni, l'identificazione e caratterizzazione dei progenitori emopoietici più immaturi (9). Per quanto riguarda l'emopoiesi umana, il fenotipo staminale è principalmente associato all'antigene CD34. Si tratta di una glicoproteina transmembrana del peso molecolare di 105-120 kd (354 aminoacidi), espressa da circa l'1 – 5% delle cellule presenti nel midollo, dallo 0.01 – 0.1% delle cellule circolanti nel sangue periferico e dallo 0.1 – 0.4% delle cellule del sangue cordonale.

Nonostante l'enorme rilievo che tale antigene ha assunto nella biologia delle cellule staminali, la sua caratterizzazione funzionale è ancora dibattuta, anche a causa dell'assenza di proteine, di funzione nota, omologhe al CD34. L'ipotesi attualmente più accreditata, basata sulla struttura aminoacidica e sul pattern di glicosilazione, è che questa glicoproteina intervenga nella modulazione dei processi di adesione ed *homing* midollare delle cellule staminali (10).

La generazione di anticorpi monoclonali diretti contro l'antigene CD34 ha aperto la strada non soltanto all'identificazione immunofenotipica dei progenitori emopoietici, ma anche alla definizione di sistemi di separazione immuno-mediata di questa rara frazione cellulare. Attualmente sono disponibili in commercio diversi anticorpi diretti contro diversi epitomi del CD34, caratterizzati in base alla diversa resistenza all'azione di taglio di enzimi quali la neuroaminidasi, la chimopapaina o la glicoproteasi.

Fino ad oggi sono state identificate tre principali sorgenti di cellule staminali emopoietiche, dalle quali la frazione CD34-positiva può essere isolata con successo: il midollo osseo, il sangue periferico e il sangue di cordone ombelicale, quest'ultimo particolarmente ricco in elementi CD34<sup>+</sup>.

Per quanto riguarda il sangue midollare e il sangue periferico, la percentuale di cellule CD34 é, in condizioni fisiologiche, particolarmente bassa. Per questo, soprattutto per l'utilizzo in sede di trapianto, si provvede ad aumentare la percentuale di recupero attraverso la somministrazione al paziente di fattori di crescita emopoietici (come G-CSF e GM-CSF), i quali, agendo a livello midollare, incrementano l'espansione del compartimento staminale e, parallelamente, ne alterano i rapporti di adesione con la componente stromale. La percentuale di progenitori emopoietici aumenta a tal punto che le cellule CD34-positive abbandonano il microambiente midollare e si riversano nel torrente circolatorio, dal quale possono essere recuperate con alta efficienza mediante *leucoaferesi*.

L'isolamento di cellule staminali basato sull'antigene CD34 permette di selezionare la frazione di progenitori ontogenicamente più immaturi, caratterizzati dall'abilità di generare aggregati clonali *in vitro* e di ricostituire *in vivo* l'emopoiesi di ospiti irradiati letalmente. E' tuttavia bene ricordare che la frazione CD34-positiva é in realtà una popolazione cellulare eterogenea, sia dal punto di vista morfologico, che immunofenotipico. Infatti, l'espressione di questa glicoproteina si può associare sia all'espressione di antigeni non-*lineage* specifici (Thy1, CD38, HLA-DR, CD45 RA, CD71), così come a quella di antigeni specifici per il differenziamento di linfociti T (CD10, CD2, CD5, CD7), di linfociti B (CD10 e CD19) e di megacariociti (CD61, CD41, CD42a).

Pur rimanendo l'espressione del CD34 un valido criterio per l'isolamento di cellule staminali, nel corso degli ultimi anni molti sforzi sono stati spesi nel tentativo di definire approci di selezione più accurati. Infatti, nonostante esistano ormai numerosi *markers* per l'identificazione di cellule staminali emopoietiche, generalmente solo una piccola frazione delle cellule isolate mediante questi criteri possiede realmente capacità staminali. Potenziali cellule staminali emopoietiche possono essere isolate mediante l'espressione dell'antigene CD34 (11-14), nell'uomo, o Sca-1 nel topo, associata all'assenza di espressione dell'antigene CD38 e di quei markers che identificano cellule che abbiano già maturato lungo le diverse filiere differenziative.

Un'altra caratteristica fondamentale delle cellule staminali emopoietiche consiste nella loro quiescenza; pertanto, la popolazione staminale può essere isolata anche in funzione del basso

contenuto di DNA o del basso livello di attività metabolica. Un esempio in questo senso è dato dalla popolazione staminale con fenotipo SP (*Side Population*), identificata nel modello murino in base a precise caratteristiche citofluorimetriche (15), acquisite in seguito a trattamento con il colorante Hoechst. Esistono infatti trasportatori della famiglia ABC, altamente espressi nella membrana dei progenitori più immaturi, che estrudono il colorante dal citoplasma cellulare: in conseguenza di questa intensa attività, i progenitori emopoietici possono essere distinti dalle cellule più differenziate, nelle quali l'attività di questi recettori è invece inferiore e quindi maggiore è la propensione a ritenere il colorante all'interno del citoplasma. Studi *in vivo* hanno confermato che la popolazione Hoechst<sup>low</sup> presenta caratteristiche di staminalità, che sono tanto più spiccate, quanto maggiore è l'espressione e l'attività dei trasportatori ABC.

Merita infine un accenno la popolazione di cellule emopoietiche CD34<sup>-</sup>. Diversi studi condotti alla metà degli anni novanta (16-18) (soprattutto ad opera dei gruppi di Bathia, Zanjani ed Osawa) hanno infatti contribuito ad affermare l'esistenza di una componente staminale, nel compartimento emopoietico sia murino che umano, caratterizzata dall'assenza dell'antigene CD34 ed in grado, tuttavia, di ripopolare l'emopoiesi di ospiti irradiati letalmente. Quale sia la relazione che intercorre tra cellule CD34<sup>-</sup> e cellule CD34<sup>+</sup> è tuttavia ancora oggetto di studio. L'ipotesi attualmente più accreditata è quella avanzata da Sato (19), in base alla quale l'espressione dell'antigene CD34 non sarebbe altro che la manifestazione di un diverso grado di attivazione funzionale all'interno dello stesso compartimento staminale. In base a questo modello, la frazione CD34<sup>-</sup> potrebbe contenere cellule staminali in fase di quiescenza che, una volta attivate, acquisirebbero in parallelo l'antigene CD34. Le cellule CD34<sup>+</sup>, oltre alla notevole capacità di ripopolare l'emopoiesi di ospiti irradiati e di differenziare lungo le diverse filiere emopoietiche, avrebbero inoltre insita anche l'abilità di regredire, ad esempio dopo trapianto, ad uno stato di quiescenza, caratterizzato dalla perdita dell'espressione del CD34 stesso (20, 21).

## II. REGOLAZIONE DEL SISTEMA EMOPOIETICO

Seppure definiti solo parzialmente, sono diversi i meccanismi e fattori umorali che contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi del compartimento staminale emopoietico. Tali fattori di regolazione vengono integrati, con dinamiche in gran parte ancora da chiarire, nel microambiente midollare, generando così peculiari “micro-nicchie” che contribuiscono al mantenimento dei progenitori emopoietici.

### 1. Il concetto di “nicchia”

Nonostante le caratteristiche di autorinnovamento e pluripotenzialità possano risiedere già a priori nel patrimonio genetico della cellula (come previsto dal modello deterministico dell'emopoiesi), l'idea che stimoli esterni e microambienti altamente specializzati prendano parte alla regolazione delle caratteristiche di staminalità sembra destinata ad influenzare la ricerca dei prossimi anni in questo settore.

Il primo studio a mettere in risalto l'effetto che il microambiente può avere sul compartimento staminale risale al 1965, quando McCulloch e Siminovitch dimostrarono l'incapacità di cellule di midollo normale di attecchire in topi Sl/Sl<sup>d</sup> (22, 23), deficitari per la produzione della forma transmembranaria di SCF. A partire da questa prima dimostrazione un numero sempre crescente di studi ha contribuito a far emergere un'ampia gamma di fattori umorali, citochine, chemochine e fattori di adesione che supportano la cellula staminale emopoietica. Di più recente acquisizione è invece l'ipotesi che tali stimoli regolatori midollari siano organizzati tridimensionalmente a generare le cosiddette “nicchie” staminali.

La nicchia si può definire come una microstruttura spaziale all'interno della quale alloggiato le cellule staminali emopoietiche, le quali, interagendo con stimoli esterni, vanno incontro a cicli di autorinnovamento. La nicchia staminale midollare rappresenterebbe, pertanto, una sorta di



“santuario della staminalità”, in grado di mantenere il compartimento staminale in tutte le sue funzioni, proteggendolo al contempo da stimoli differenziativi.

Le caratteristiche della nicchia possono essere così riassunte:

1. il numero di cellule staminali all'interno della nicchia è strettamente regolato;
2. il mantenimento della staminalità dipende dall'interazione eterologa con cellule istologicamente diverse;
3. gli stimoli prodotti dalla nicchia forniscono la base molecolare per l'interazione fisica tra cellule, nonché la trasduzione di segnali attivatori o inibitori, che presiedono all'espansione del compartimento staminale;
4. il raggiungimento della nicchia può indurre caratteristiche di pseudo-staminalità anche in cellule (ad esempio, cellule tumorali), che non sono formalmente tali.

Tutte queste caratteristiche suggeriscono quindi che la nicchia staminale non svolga soltanto una funzione di supporto, ma abbia anche il potenziale intrinseco di guidare il destino delle cellule che la occupano.

Comprendere come la nicchia funzioni richiede, in primo luogo, una precisa caratterizzazione istologica del midollo osseo. Quello che fino a non molti anni fa veniva elusivamente indicato come “stroma midollare” di supporto, è in realtà un coacervo istologico di cellule mesenchimali, adipociti, osteoblasti, macrofagi, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce della parete dei sinusoidi, che infiltrano la struttura di osso trabecolare. Tutte queste cellule contribuiscono a generare una struttura architettale di supporto unica nel suo genere, oltre che secernere citochine e chemochine fondamentali per supportare il compartimento emopoietico. In particolare, studi con progenitori emopoietici marcati *ex vivo* e poi tracciati *in vivo* hanno mostrato che tali cellule sembrano prediligere una localizzazione prossima all'endosteo, mentre le cellule in via di differenziamento o prossime alla maturazione terminale sembrano acquisire progressivamente posizioni più distali.

L'endosteo, punto di contatto tra osso ed emopoiesi, rappresenta pertanto una probabile sede di microambienti regolativi. Risultati di ricerche condotte negli ultimi anni hanno mostrato in modo inequivocabile il ruolo chiave svolto dagli osteoblasti nella regolazione del compartimento staminale. La “nicchia osteoblastica”, che si distingue per l'alto contenuto in

glicoproteine extracellulari e l'alta densità di sali di calcio, svolge un ruolo primario nel mantenere la quiescenza di cellule staminali emopoietiche.

L'analisi dettagliata della microvascolatura midollare ha recentemente fatto emergere l'ipotesi che possa esistere anche una “nicchia perivascolare/endoteliale”. Si tratterebbe di un microambiente più dinamico rispetto alla nicchia osteoblastica, in quanto si suppone che presieda, principalmente, alla regolazione di funzioni quali proliferazione e differenziamento, nonché migrazione transdoteliale ed *homing*.

## 2. Caratteristiche biomolecolari dell'interfaccia cellula staminale-nicchia.

Gli studi condotti negli ultimi anni, nel tentativo di elucidare i meccanismi alla base dell'attività regolativa della nicchia, hanno messo in luce l'esistenza di un complesso apparato molecolare attraverso il quale le cellule staminali comunicano con il microambiente midollare. A definire tale cornice molecolare contribuiscono chemochine, citochine, molecole di adesione, enzimi, recettori e molecole di trasduzione del segnale. Queste molecole promuovono, all'interno della nicchia, almeno due tipi di interazioni:

1. **Interazioni ligando-recettore**, attraverso le quali vengono attivate vie di trasduzione del segnale.
2. **Interazioni adesive** tra cellule staminali e componenti della matrice extracellulare o interazioni cellula-cellula. La funzione principale di questo tipo di interazioni sarebbe quella di mantenere le cellule staminali in stretto contatto con le cellule della nicchia osteoblastica e perivascolare.

Inoltre, molti recettori per molecole di adesione (come le stesse integrine) sono in grado di trasdurre cascate del segnale e di partecipare attivamente alla rete di segnali che promuove il mantenimento del compartimento staminale.

Le seguenti tabelle riassumono i principali attori della regolazione del microambiente midollare, finora conosciuti.

**a. Interazioni ligando-recettore: vie di trasduzione del segnale.**

<b>Via di trasduzione del segnale (HSCs/nicchia)</b>	<b>Ruolo nella nicchia staminale</b>
c-kit/SCF	proliferazione e sopravvivenza; attivazione e rilascio dalla nicchia
Notch/Jag1	espansione del compartimento staminale, mantenendo le cellule in uno stato indifferenziato
Tie2/Ang-1	Tie2 media l'adesione delle cellule staminali agli osteoblasti, promuovendone la quiescenza
Sensore per il calcio extracellulare (CaR)	promuove la ritenzione di cellule staminali sulla superficie dell'endosteo (nicchia osteoblastica)
?/BMP Wnt/?	autorinnovamento
FGF Hedgehog IL-3 IL-6 TPO	proliferazione (da confermare l'effettivo ruolo nella nicchia <i>in vivo</i> )
Integrine/VCAM	proliferazione e differenziamento
Integrina $\beta_1$ /Osteopontina	quiescenza

**b. Interazioni adesive.**

<b>Interazione adesiva</b>	<b>Ruolo nella nicchia staminale</b>
N-caderina/ $\beta$ -catenina	Ancoraggio alla nicchia osteoblastica e distribuzione spaziale della progenie di cellule staminali proliferanti
Integrine/VCAM	Proliferazione e differenziamento

Integrina $\beta_1$ /Osteopontina CD44/Acido Ialuronico Integrine/Fibronectina	Migrazione attraverso lo stroma midollare e verso l'endosteo
--	--

***c. Chemochine e vie di trasduzione associate a chemochine.***

<b><i>Chemochine/Via di trasduzione del segnale</i></b>	<b><i>Ruolo nella nicchia staminale</i></b>
CXCR4/CXCL12	Migrazione ed <i>homing</i> sopravvivenza e proliferazione
Rac GTPasi	Migrazione ed <i>homing</i> sopravvivenza e proliferazione
Catepsina G MMP-2 MMP-9	Enzimi necessari per il superamento della barriera endoteliale

### III. MIGRAZIONE CELLULARE

La migrazione cellulare è un processo biologico di fondamentale importanza tanto per i semplici organismi unicellulari, quanto per organismi di complessa struttura pluricellulare. Tuttavia, se negli organismi unicellulari, come le amebe, la principale funzione dei processi migratori riguarda principalmente la riproduzione e la ricerca di nutrienti, negli organismi pluricellulari la migrazione è un requisito indispensabile per lo sviluppo di funzioni specializzate, che vanno dall'organizzazione tissutale, all'organogenesi o al semplice mantenimento di funzioni omeostatiche in condizioni basali (24). Quella che per anni è stata vista come una funzione cellulare accessoria, sta emergendo come un fenomeno indispensabile per innumerevoli processi biologici, la cui complessità sta solo ora iniziando ad essere rivelata. Il processo di migrazione cellulare richiede infatti il coinvolgimento di numerose funzioni specializzate, che vanno dalla formazione di complessi di adesione e polarizzazione delle strutture cellulari, fino al riarrangiamento delle strutture citoscheletriche.

E' interessante notare che, negli organismi più complessi, istotipi cellulari diversi si caratterizzano per una diversa attività migratoria: ad esempio, i leucociti presentano una motilità di tipo ameboide, mentre i cheratinociti migrano attraverso il tessuto circostante mediante una continua interazione con le cellule vicine. Inoltre, anche interi gruppi di cellule possono migrare in modo sincrono e coordinato, come dimostrato dal movimento dei foglietti epiteliali durante i processi di gastrulazione o di riparazione delle ferite.

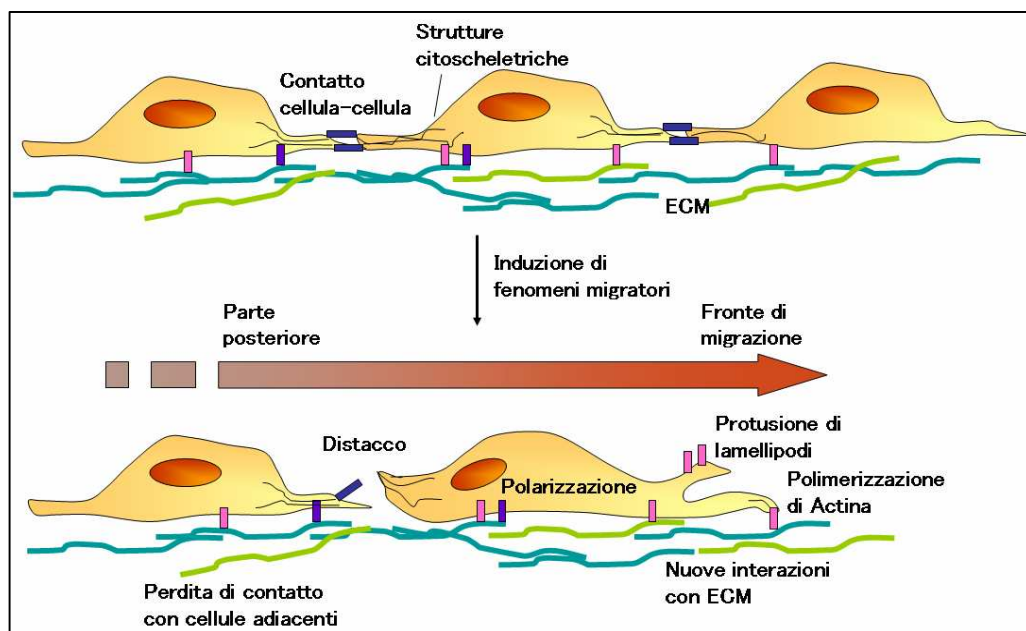
I precedenti esempi indicano già come i fenomeni di migrazione cellulare siano un processo fondamentale, che modella l'individuo durante lo sviluppo embrionale e per tutta la durata della vita. I processi di gastrulazione e di morfogenesi durante l'embriogenesi sono strettamente dipendenti dalla capacità delle cellule di rispondere a determinati stimoli chemotattici, di migrare lungo percorsi specifici, nonché di interagire in modo appropriato con i microambienti circostanti. Alterazioni della capacità migratoria in queste fasi possono condurre a gravi difetti di sviluppo e ad anomalie congenite (soprattutto a carico del sistema nervoso), quando non addirittura alla totale incapacità del feto di svilupparsi.

Nell'individuo adulto, i fenomeni di migrazione cellulare sono fondamentali per il mantenimento di processi omeostatici, quali l'instaurarsi delle risposte immunitarie o la riparazione di ferite o tessuti danneggiati. Tuttavia, i processi migratori possono partecipare anche allo sviluppo di condizioni patologiche, come disturbi dell'apparato vascolare, malattie infiammatorie croniche, nonché formazione di masse tumorali e loro disseminazione con formazione di metastasi a distanza. La comprensione dei meccanismi molecolari alla base della migrazione cellulare diviene quindi di fondamentale importanza non solo per il fenomeno biologico in sé, ma anche per aprire la strada allo sviluppo di approcci terapeutici alternativi per numerose patologie, per le quali non esiste ancora un valido trattamento.

## **1. Principi dinamici della migrazione cellulare**

La migrazione cellulare può essere descritto come un processo ciclico estremamente dinamico, che richiede il perfetto coordinamento di numerose, complesse attività cellulari (Figura 2). Dal punto di vista concettuale, una cellula migrante può essere descritta come un'entità altamente

polarizzata, con attività e strutture molecolari spazialmente segregate. Questa distribuzione funzionale asimmetrica consente di distinguere un fronte di migrazione e una porzione cellulare posteriore. Affinché una migrazione regolata e direzionale abbia luogo, le attività di queste due porzioni, pur se separate spazialmente, devono essere estremamente coordinate.



**Figura 2.** Schema rappresentativo delle interazioni dinamiche che caratterizzano la migrazione direzionale di una cellula aderente ad un substrato.

Il processo di migrazione direzionale prende inizio con la risposta della cellula ad uno stimolo chemiotattico, proveniente dal microambiente circostante, che induce la polarizzazione delle strutture cellulari e la conseguente estensione di una protusione citoplasmatica (guidata dal riarrangiamento dei filamenti di actina) nella direzione del movimento. La successiva formazione di complessi di adesione, permette al fronte cellulare protrudente di interagire con il substrato circostante. Tali interazioni adesive servono, in parte, come punti di trazione per la migrazione, ma agiscono anche come segnali regolatori della intera dinamica cellulare. Successivamente si assiste alla contrazione del corpo cellulare e alla rottura delle interazioni

adesive della porzione posteriore, che a questo punto si retrae, completando il ciclo di attività associate al movimento direzionale.

E' tuttavia importante sottolineare che le informazioni relative a questo modello sono state in gran parte ottenute studiando il comportamento di cellule *in vitro*, migranti in un ambiente bidimensionale. Una comprensione approfondita della migrazione cellulare *in vivo* non può tuttavia prescindere dallo studio di cellule in movimento all'interno di spazi tridimensionali, cosa che si sta tentando di fare attraverso lo sviluppo di modelli sperimentali di migrazione in tre dimensioni, che consentano di monitorarne i riarrangiamenti morfologici e molecolari in condizioni analoghe a quelle fisiologiche (24).

## 2. Meccanismi di migrazione e polarizzazione cellulare.

Il punto chiave dei meccanismi di migrazione risiede nell'innescò della polarizzazione delle strutture sub-cellulari. Un ampio gamma di molecole presenti nel microambiente extracellulare è stata in particolare descritta come capace di dare inizio e promuovere i processi di polarizzazione e migrazione cellulare. A seconda delle molecole stimolatorie, si distinguono tre tipi fondamentali di risposta migratoria:

- **Chemochinesi:** risposta cellulare a molecole in grado di indurre un fenotipo migratorio adirezionale, attraverso un incremento/diminuzione della velocità e frequenza dei movimenti cellulari, oppure mediante un aumento/decremento della frequenza o entità di movimenti rotatori.
- **Chemiotassi:** processo di migrazione direzionale, guidato da gradienti di sostanza chemio-attrattive/-repulsive all'interno di un determinato microambiente extracellulare.
- **Aptotassi:** processo di migrazione direzionale secondo un gradiente di molecole di adesione o di molecole chemio-attrattive/-repulsive legate ad un substrato. Gradienti adesivi di questo tipo si trovano normalmente all'interno della matrice extracellulare.

Le molecole in grado di indurre tali risposte migratorie sono state studiate in particolare nei leucociti, il cui *pattern* di migrazione verso i focolai flogistici rappresenta tuttora il miglior modello, seppur approssimativo, delle dinamiche di migrazione delle cellule staminali emopoietiche da, e verso, il microambiente midollare.

### 3. Il *network* chemochinico

Con il termine *chemochine* si fa riferimento ad una famiglia di oltre quaranta proteine di piccole dimensioni (circa 8 kDa), strutturalmente e funzionalmente correlate tra di loro. Anche se attive su popolazioni cellulari diverse e in microambienti distinti, tutte le molecole ad attività chemochinica si caratterizzano, dal punto di vista funzionale, per la capacità di guidare il movimento di cellule lungo gradienti chemiotattici (attrattivi o repulsivi), un fenomeno fondamentale per l'organizzazione spaziale delle cellule all'interno di un organo o per la corretta distribuzione di leucociti e cellule del sistema immunitario attraverso l'organismo (25). Tali molecole, insieme ad altri fattori di crescita e citochine, partecipano inoltre alla regolazione di un'ampia gamma di funzioni cellulari, quali proliferazione e differenziamento di progenitori immaturi, attraverso l'attivazione di complessi di adesione, di processi di riarrangiamento citoschletrico, di controllo del ciclo cellulare, nonché secrezione di enzimi proteolitici.

Le prime due "citochine chemiotattiche" (PF4 e  $\beta$ -tromboglobulina) furono identificate nelle piastrine negli anni Settanta, ma solo ne decennio successivo venne dimostrato che queste molecole appartenevano ad un gruppo più ampio di proteine, correlate tra loro da strutture analoghe.

Dal punto di vista strutturale, si distinguono quattro gruppi di chemochine:

1. **famiglia CXC**, caratterizzata da due residui di cisteina conservati, separate tra di loro da un residuo aminoacidico variabile;



2. **famiglia CC**, caratterizzata da due residui di cisteina conservati;
3. **famiglia XC**, comprendente chemochine analoghe a quelle del primo gruppo, ma con un solo residuo di cisteina;
4. **famiglia CX<sub>3</sub>C**, in cui i due residui di cisteina sono separati da tre residui aminoacidici variabili.

Questa separazione su base strutturale ha tuttavia pochi riscontri a livello funzionale. Ciascuna chemochina può infatti esercitare la sua funzione chemiotattica su cellule molto diverse, in sedi anatomiche diverse, rendendo particolarmente difficile una classificazione su basi funzionali (25).

Si può tuttavia operare una distinzione in base al profilo di espressione. Nell'adulto, la maggiorparte delle citochine presenta un profilo di espressione **inducibile** e viene secreta in concomitanza di situazioni di *stress* fisiologico o di danno cellulare, andando ad agire come mediatori di segnali di pericolo, come parte di fenomeni di difesa e di riparazione. In tali situazioni, la principale funzione del *network* citochinico è quella di reclutare leucociti, stimolandone la migrazione direzionale ed attirandoli nei siti di danno e flogosi. Ne è un esempio la chemochina CCL5, in grado di attirare eosinofili, monociti e linfociti nelle sedi di focolai flogistici.

Esistono tuttavia anche chemochine **costitutivamente espresse**, che svolgono un ruolo chiave nei processi di organogenesi a livello embrionale e nella regolazione omeostatica di specifici microambienti o nicchie regolatorie. Ne è un esempio la chemochina CXCL12 (*stromal cell derived factor*, SDF-1), per la quale è stata dimostrata un'espressione costitutiva, sia nel topo che nell'uomo, da parte delle cellule endoteliali del midollo osseo, così come da parte delle cellule stromali che contornano la porzione endosteale dell'osso, regioni tra l'altro nota come sede della nicchia emopoietica. L'espressione continua di CXCL12 è principalmente responsabile della regolazione del traffico e della localizzazione di leucociti maturi e in via di maturazione (34, 35).

#### 4. I recettori chemochinici

L'attività attrattiva esercitata dalle chemochine si esplica attraverso il legame di specifiche molecole recettoriali espresse sulla membrana delle cellule bersaglio. Come i loro ligandi, anche i recettori chemochinici vengono suddivisi in quattro famiglie, i cui nomi derivano dalla struttura delle chemochine stesse: CCR, CXCR, XCR e CX<sub>3</sub>CR.

Una peculiarità di questa famiglia di molecole riguarda l'alto grado di promiscuità che caratterizza l'interazione ligando-recettore. Ad esempio, nonostante chemochine CC leghino esclusivamente recettori CC, ciascuna chemochina CC è in realtà in grado di interagire con molteplici recettori CC. Lo stesso vale, analogamente, per i recettori CC, essendo ciascuno in grado di legare diverse chemochine CC. Ciò che conferisce specificità alla attività chemochinica è in gran parte dipendente dalla fine regolazione dell'espressione dei recettori chemochinici, la cui presenza in membrana varia consensualmente ai diversi stati differenziativi e maturativi che un certo tipo di cellula può attraversare. Il CXCL12 rappresenta tuttavia, ancora una volta, un'eccezione nell'ambito della famiglia di chemochine in quanto questa chemochina e il suo recettore CXCR4, si distinguono per la stretta monogamia della loro interazione, senza legami spurie con altri membri del gruppo. Indipendentemente dalla famiglia di appartenenza, tutti i recettori chemochinici presentano la tipica struttura dei recettori a sette domini transmembranari, caratteristica anche dei recettori di molti ormoni e neurotrasmettitori. In seguito al legame del recettore, viene attivata una complessa cascata di trasduzione del segnale, che conduce all'incremento dei livelli di fosfatidilinositolo-3-fosfato (PIP<sub>3</sub>) e all'attivazione di proteine serin-chinasiche (PKB e Akt), delle chinasi MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) e di PKC. E' stato dimostrato che l'attivazione di queste chinasi è implicata nella regolazione di molteplici funzioni cellulari, che non riguardano soltanto la motilità cellulare, ma anche i processi di adesione, proliferazione e sopravvivenza cellulare.

In seguito all'attivazione, il legame dei recettori chemochinici si traduce tipicamente nella loro rapida internalizzazione ed inattivazione. A complicare ulteriormente la natura delle interazioni tra recettori e chemochine va l'abilità di queste ultime di formare sia omo- che

etero-dimeri. E' stato infatti dimostrato che i fenomeni di dimerizzazione sono in grado di alterare la funzione delle chemochine coinvolte, sia incrementandone, sia diminuendone il potenziale chemiotattico.

#### IV. I FENOMENI DI MIGRAZIONE ALL'INTERNO DEL SISTEMA

##### EMOPOEITICO

##### *Mobilizzazione, Homing e Attecchimento di Cellule Staminali Emopoietiche*

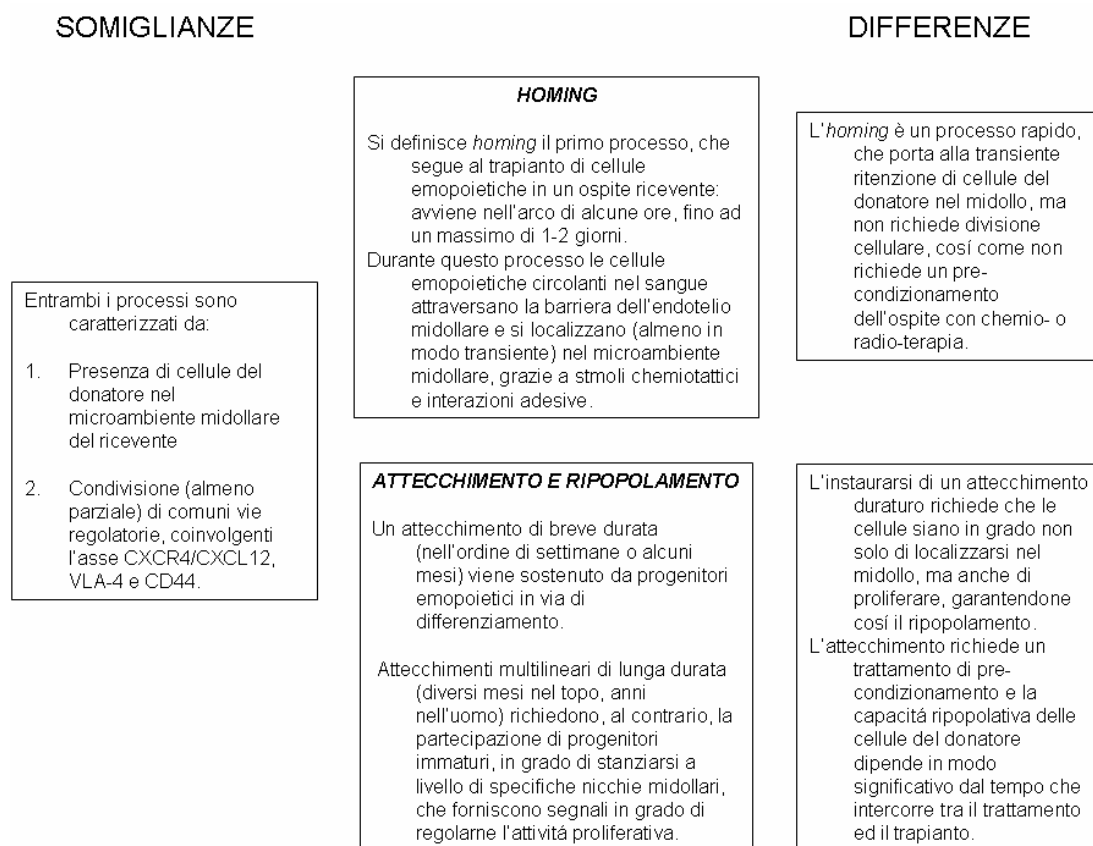
Accanto alle proprietà di autorinnovamento e pluripotenzialità, esiste un'altra fondamentale caratteristica che concorre a definire i progenitori staminali emopoietici, vale a dire la capacità migratoria.

Questa proprietà gioca un ruolo fondamentale già durante lo sviluppo embrionale, consentendo alle cellule staminali di circolare attraverso i diversi siti anatomici, sedi di processi emopoietici: dal sacco vitellino alla regione AGM (*Aorta-Gonad-Mesonephros*), da questa al fegato fetale e da quest'ultimo al midollo osseo, che almeno nell'uomo rappresenta il sito emopoietico d'elezione nell'individuo adulto.

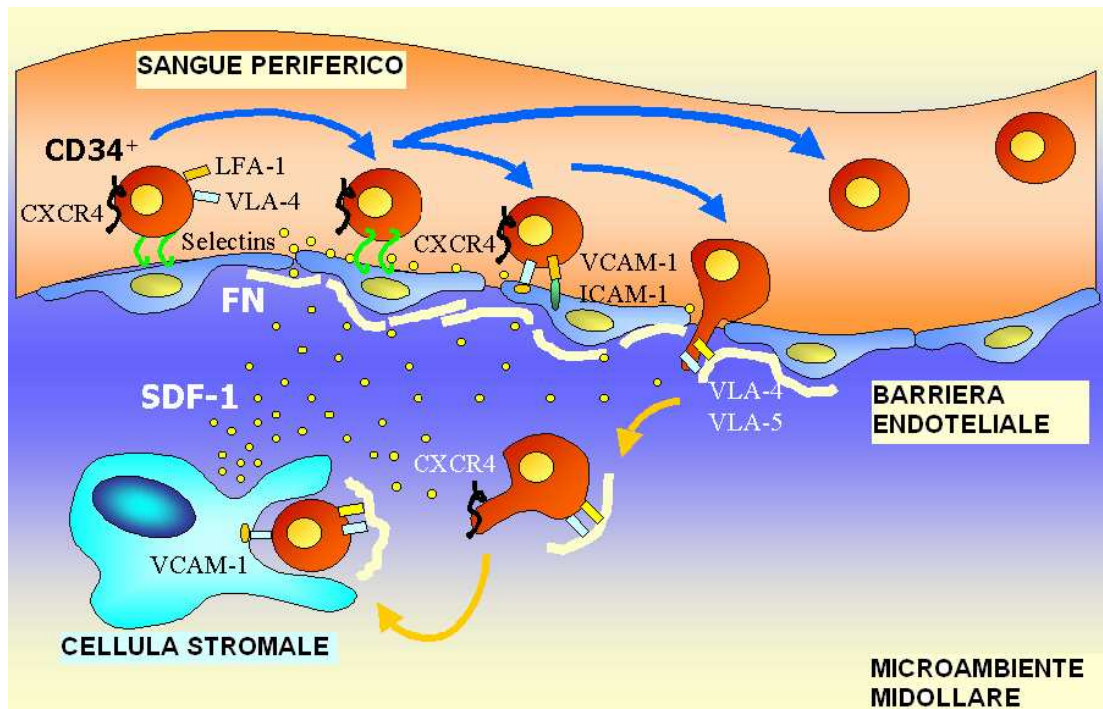
Tuttavia, anche nell'adulto i fenomeni di migrazione dei progenitori emopoietici sembrano svolgere un ruolo di prim'ordine, soprattutto nel mantenimento dell'omeostasi del sistema emopoietico, come dimostrato dal fatto che, per tutta la durata della vita dell'individuo è possibile trovare (seppure in basse percentuali) cellule staminali circolanti nel sangue periferico. La percentuale delle cellule circolanti può tuttavia aumentare drasticamente in seguito a trattamenti con farmaci (quali la ciclofosfamide), citochine (G-SCF o SCF) o chemochine (IL-8), le quali inducono la **mobilizzazione** di progenitori emopoietici dal compartimento midollare verso il sangue periferico. Il fenomeno complementare al processo di mobilizzazione viene definito **homing**: con questo termine si fa riferimento alla complessa serie di fenomeni che conducono alla migrazione di progenitori e cellule staminali emopoietiche in senso contrario, cioè dal sangue periferico al micromambiente midollare. In presenza di peculiari condizioni permissive, il processo di *homing* può preludere

all'**attecchimento** a lungo termine delle cellule staminali in specifiche nicchie midollari, dove il complesso *cocktail* di citochine, chemochine e fattori di crescita ne regola la sopravvivenza, la proliferazione o il differenziamento nelle diverse filiere emopoietiche.

Mobilizzazione ed *homing* vengono descritti come processi complementari, in quanto si ritiene che, almeno in linea generale, le interazioni che devono essere distrutte per consentire il rilascio dei progenitori dal midollo, siano le stesse che è necessario ristabilire per permettere loro di abbandonare la circolazione e ritornare nel microambiente midollare.



In particolare, dal punto di vista meccanicistico, si ritiene che l'*homing* sia un processo multifase (26), con notevoli analogie con i fenomeni di migrazione ed extravasazione leucocitaria verso le sedi di focolai flogistici, come schematizzato nella Figura 3.



**Figura 3.** Schema delle interazioni-chiave che caratterizzano la migrazione di cellule staminali emopoietiche dal circolo ematico verso il microambiente midollare, durante il processo di *homing* (modificato da Peled et al. *Blood*).

In particolare, in base al modello proposto dal gruppo di studio di Tsvee Lapidot, l'*homing* di cellule staminali emopoietiche nel midollo osseo può essere descritto come la successione di diverse fasi tra loro finemente coordinate:

1. **Rotolamento sull'endotelio vascolare.** Le cellule staminali emopoietiche che si trovano nel circolo ematico (ad esempio dopo reinfusione di cellule staminali per il trapianto) instaurano interazioni deboli con molecole di adesione (selectine E e P) espresse costitutivamente dall'endotelio vascolare. Tali interazioni deboli, si instaurano e si rompono ciclicamente, permettendo alle cellule di *rotolare* sulla superficie endoteliale.

2. **Attivazione.** In seguito all'interazione con l'endotelio vascolare, le cellule staminali che esprimono il recettore CXCR4 vengono attivate dal gradiente chemioattrattivo di CXCL12 (prodotto e secreto dalle cellule dell'endotelio midollare). In seguito all'interazione di CXCL12 con il proprio recettore, si assiste alla stimolazione dei legami LFA-1/ICAM-1 e VLA-4/VCAM-1, che mediano interazioni e adesioni più forti, arrestando le cellule staminali sulla superficie endoteliale. Le cellule staminali che non esprimono il recettore CXCR4, al contrario, si distaccano dall'endotelio e ritornano in circolo.
  
3. **Extravasazione.** Le cellule CXCR4<sup>+</sup>, una volta arrestate sull'endotelio, rispondono al gradiente attrattivo di CXCL12 ed iniziano ad extravasare, sfruttando le fenestrazioni presenti nella barriera endoteliale, e penetrano attraverso la sottostante lamina basale. Tale migrazione è resa possibile soprattutto grazie alle interazioni delle integrine VLA-4 e VLA-5 con i filamenti di Fibronectina presenti nella matrice extracellulare.
  
4. **Homing nel microambiente midollare.** Le cellule staminali raggiungono infine la nicchia midollare, vale a dire quel peculiare microambiente, caratterizzato da una particolare composizione in popolazioni cellulari (cellule stromali ed endoteliali), molecole di adesione (come VCAM-1 e Fibronectina), fattori chemiotattici (CXCL12) e fattori di crescita in grado di mantenere staminalità e quiescenza delle cellule che si annidano nella nicchia.

Il modello delineato non è altro che il frutto degli studi condotti negli ultimi dieci anni, nel tentativo di comprendere quali, tra le interazioni che le cellule staminali ingaggiano con il microambiente midollare, siano fondamentali nei processi di *homing* e mobilizzazione. Le principali, tra queste interazioni, sono riportate e discusse di seguito (26-32).

### **1. VLA-4 ed altre integrine**

La molecola VLA-4 è un'integrina ( $\alpha_4\beta_1$ ) espressa sulla superficie di cellule staminali e progenitori emopoietici. VLA-4 è in grado di legare una delle principali componenti della matrice extracellulare, la fibronectina, nonché la molecola VCAM-1 (CD106), che è costitutivamente espressa da cellule endoteliali e stromali.

L'attivazione di VLA-4 promuove la sopravvivenza e l'attecchimento dei progenitori emopoietici, ma svolge un ruolo fondamentale anche nel garantirne le interazioni adesive e la ritenzione nel microambiente midollare. E' stato infatti dimostrato che la somministrazione *in vivo* di anticorpi anti-VLA-4 induce mobilitazione di progenitori emopoietici nel sangue periferico.

Altre integrine plausibilmente coinvolte nei fenomeni di *homing* e mobilitazione sono VLA-5, LFA-1 e il CD18, le quali potrebbero svolgere effetti sinergici nei confronti del VLA-4.

### **2. Interazione tra CD44 ed Acido Ialuronico**

L'acido ialuronico, appartenente alla famiglia dei glicosaminoglicani, è uno dei principali componenti della matrice extracellulare. Le cellule staminali ed i progenitori emopoietici esprimono due recettori di membrana specifici per questa molecola: il CD44 e RHAMM. Tuttavia, il CD44 stesso, oltre ad interagire con l'acido ialuronico, può legare anche la Selectina-E, espressa sulla superficie delle cellule endoteliali dei sinusoidi midollari.

Seppure in misura minore rispetto a quanto osservato nel caso dell'integrina VLA-4, anche anticorpi anti-CD44 hanno un effetto mobilizzante, suggerendo che l'interazione di questo recettore con i suoi ligandi contribuisce alla ritenzione delle cellule staminali nell'ambiente midollare.

### ***3. Interazione tra c-kit e SCF***

Il ruolo del fattore di crescita *Stem Cell Factor* (SCF) nel promuovere le caratteristiche di staminalità dei progenitori emopoietici è nota da lungo tempo. Solo di recente, però, è emerso che l'interazione di questa citochina (in particolare, nella forma transmembranaria) con il recettore c-kit è fondamentale nel garantire l'*homing* verso il midollo dopo trapianto e nel mantenere le cellule staminali nel microambiente midollare in condizioni omeostatiche.

La distruzione dell'interazione c-kit/SCF sembra quindi rappresentare un potenziale meccanismo per indurre la mobilitazione in periferia di cellule staminali.

### ***4. Il ruolo delle proteasi***

In base a quanto descritto finora, tutte le interazioni che le cellule staminali ingaggiano con il microambiente midollare (VLA-4/VCAM-1, c-kit/SCF, CD44/acido ialuronico e, come discusso in seguito, CXCR4/CXCL12) devono venire distrutte per consentirne la mobilitazione in circolo.

Uno dei fenomeni implicati nella rottura di queste interazioni coinvolge l'azione di enzimi ad attività proteolitica (come la Catepsina G e l'Elastasi), in grado di degradare VCAM-1, il CXCL12, nonché il CXCR4 stesso. Ad esempio, l'induzione alla secrezione di queste proteasi da parte dei neutrofilo a livello midollare sembra essere uno dei principali meccanismi alla base dell'azione mobilizzante del G-CSF.

Esiste un altro gruppo di enzimi proteolitici, le metalloproteasi, che partecipa sia ai processi di mobilitazione che di *homing* midollare. Le metalloproteasi sono infatti responsabili della degradazione proteolitica dei componenti della matrice extracellulare e della membrana basale vascolare e giocano un ruolo fondamentale anche nel mediare i processi di invasione e metastatizzazione dei tumori. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato che la metalloproteasi-9 (MMP-9) è in grado di distruggere anche alcune delle interazioni cellula-cellula che avvengono



nel midollo, ad esempio causando il rilascio dello SCF-transmembranario dalle cellule stromali midollari, con conseguente promozione di fenomeni di mobilitazione.

### ***5. Interazione tra CXCR4 e CXCL12***

L'attivazione del recettore CXCR4 da parte della chemochina CXCL12 (nota anche, secondo la vecchia nomenclatura, come SDF-1, *Stromal cell-Derived Factor-1*) rappresenta senza dubbio uno degli assi trasduzionali più studiati negli ultimi anni, a causa del ruolo chiave che esso svolge nella biologia del comportamento migratorio di cellule staminali emopoietiche.

A dimostrazione dell'importante funzione biologica svolta dal CXCL12, la sequenza aminoacidica di questa chemochina è estremamente conservata tra le diverse specie nel corso dell'evoluzione, tanto che la chemochina umana e la corrispondente murina sono in grado di cross-reagire. CXCL12 svolge un ruolo di primaria importanza già durante lo sviluppo embrionale; modelli sperimentali murini di *knockout* genico per CXCL12 o per il suo recettore CXCR4 presentano difetti a cuore, intestino, sistema circolatorio e nervoso, che si rivelano letali già nelle prime fasi di sviluppo. Inoltre, significativa è la mancata capacità, da parte dei progenitori emopoietici, di colonizzare il midollo osseo, fenomeno che si può correlare al ruolo di CXCL12 nel regolare la migrazione di cellule staminali emopoietiche e il loro *trafficking* tra le diverse nicchie emopoietiche.

Questi studi hanno contribuito a delineare CXCL12 come la principale e più potente chemochina attrattiva per cellule staminali emopoietiche, sia nel modello murino che nell'uomo (33). I meccanismi che regolano a monte l'attività di CXCL12 rimangono, tuttavia, in gran parte ancora da caratterizzare. Attualmente si ritiene che l'espressione di CXCL12, così come del recettore CXCR4, sia estremamente dinamica e regolata da meccanismi di secrezione autocrina e paracrina. In particolare, CXCR4 è largamente espresso, all'interno del midollo osseo, da parte delle cellule emopoietiche immature o in via di maturazione, di cui ne regola finemente i processi di *homing*, ritenzione a livello midollare o migrazione ed ingresso in circolo. Degna di nota è inoltre l'elevata espressione sia di CXCL12 che di CXCR4 da parte

delle cellule stromali e delle cellule endoteliali midollari, che sembra confermare l'esistenza di circuiti di stimolazione autocrina e paracrina all'interno del microambiente midollare.

***Interazione CXCL12/CXCR4 tra cellule emopoietiche e cellule stromali nell'ambiente midollare: ritenzione dei progenitori emopoietici a livello midollare.***

La ritenzione ed il mantenimento del *reservoir* midollare di cellule staminali emopoietiche vengono regolati dalla interazione tra il *pool* di progenitori emopoietici immaturi, leucociti in via di maturazione, cellule stromali collocate in prossimità dell'*endosteum* (regione identificata come sito primario della nicchia emopoietica midollare), nonché cellule endoteliali. In particolare, l'interazione tra il recettore CXCR4 (espresso dai progenitori emopoietici) e il fattore CXCL12 (prodotto dalle cellule stromali) è stata dimostrata svolgere un ruolo cardine nel promuovere la ritenzione di tali cellule a livello midollare, nonché di favorire il ripopolamento del midollo dopo trapianto. Tant'è vero che, l'iper-espressione del recettore CXCR4 si associa, in modelli sperimentali, ad un migliore attecchimento midollare; al contrario, una ridotta espressione del CXCR4 o l'inibizione della sua cascata trasduzionale del segnale si traduce in una considerevole diminuzione del potenziale ricostituivo delle cellule emopoietiche trapiantate.

E' inoltre interessante notare che il fattore CXCL12 è in grado di stimolare risposte cellulari diverse, a seconda della sua concentrazione. In termini estremamente schematici, alte concentrazioni di CXCL12 inducono desensitizzazione ed internalizzazione recettoriale, stimolando le cascate del segnale che garantiscono sopravvivenza cellulare e quiescenza. Al contrario, a basse concentrazioni, CXCL12 stimola in modo preferenziale la secrezione di metalloproteasi, migrazione cellulare, proliferazione e, insieme ad altre citochine, fenomeni di differenziamento. Tuttavia, è bene ricordare che esiste a livello midollare una rete estremamente complessa di *networks* in grado di controllare le risposte cellulari, dovute alla reciproca modulazione dei livelli di CXCL12 e CXCR4 in cellule stromali ed emopoietiche,

che controllano la ritenzione dei progenitori emopoietici ed le dinamiche di rimodellamento della nicchia da parte della componente stromale.

Accanto a questi rilevanti fenomeni fisiologici, un numero sempre crescente di studi sembra indicare un ruolo chiave dell'asse CXCL12-CXCR4 anche a livello patologico, in particolare nella regolazione di processi di metastatizzazione, come recentemente mostrato in un modello di carcinoma mammario (36).

***Interazione CXCL12/CXCR4 tra cellule emopoietiche e cellule stromali nell'ambiente midollare: mobilitazione di progenitori emopoietici.***

Nonostante il compartimento emopoietico staminale sia prevalentemente localizzato a livello midollare (in prossimità della nicchia endosteale ed endoteliale), una piccola frazione di cellule staminali emopoietiche circola liberamente nel sangue, a causa di fenomeni di regolazione omeostatica che, anche in condizioni normali, ne garantiscono il continuo rilascio dal midollo. Si ritiene che tale processo sia la conseguenza di meccanismi di difesa e/o di riparazione tissutale, cui tali cellule potrebbero prendere parte. Come discusso nel paragrafo precedente, l'asse trasduzionale CXCL12/CXCR4 gioca un ruolo centrale nel favorire l'*homing* di cellule staminali verso un gradiente attrattivo di CXCL12, espresso da cellule endoteliali e stromali, nonché il loro ancoraggio all'interno del microambiente midollare. Tuttavia, il rilascio in circolo di leucociti maturi ed in via di maturazione, così come di progenitori emopoietici immaturi, suggerisce l'esistenza di fenomeni regolatori addizionali in grado di soverchiare l'effetto di ritenzione esercitato da CXCL12 a livello midollare. Inoltre, durante situazioni di pericolo, di danno tissutale o di stress, la fuoriuscita di progenitori immaturi dal midollo (fenomeno noto come *mobilitazione*) aumenta sensibilmente. Fenomeni flogistici, trattamenti con farmaci chemioterapici o con fattori di crescita, quali il G-CSF, si sono mostrati in grado di minare l'omeostasi del *reservoir* staminale, inducendo proliferazione, differenziamento e mobilitazione in circolo dei progenitori emopoietici più immaturi. Pertanto, l'asse CXCR4/CXCL12 non è coinvolto soltanto nella regolazione dei processi di *homing* e

ritenzione all'interno del midollo osseo, ma è uno dei principali mediatori della mobilizzazione e del reclutamento in circolo di progenitori emopoietici in seguito a situazioni di stress e di danno tissutale. Utilizzando un modello di parabiosi (costituito da due topi con circolazione congiunta sperimentalmente), Abkovitz et al. hanno dimostrato un significativo innalzamento dei progenitori emopoietici circolanti, con conseguente rilocalizzazione ed *homing* nel midollo osseo della controparte, rispetto ai bassi livelli di mobilizzazione ed attecchimento osservanti in assenza di trattamento con G-CSF. Questo studio dimostra che, durante situazioni di stress e danno tissutale, non soltanto i processi di mobilizzazione, ma anche quelli di *homing* risultano incrementati, evidenziando che tali fenomeni sono fisiologicamente inter-connessi e sequenziali. In particolare, diversi studi hanno contribuito a supportare l'ipotesi che mobilizzazione ed *homing* siano fenomeni speculari, in parte regolati dai medesimi meccanismi. Ad esempio, il fattore G-CSF può agire tanto sulla migrazione cellulare, quanto sul microambiente midollare. Il trattamento con il fattore di crescita granulocitario induce un incremento nei livelli midollari di CXCL12, che a sua volta stimola proliferazione e differenziamento dei progenitori emopoietici, attivazione e proliferazione dei neutrofilii, rilascio dell'SCF transmembranario, nonché aumentata secrezione di enzimi proteolitici (quali catepsina G, elastasi e MMP-9). A seguire, si assiste alla degradazione del CXCL12 stesso, intensa mobilizzazione dei leucociti in via di maturazione ed, infine, reclutamento in circolo di cellule staminali e progenitori emopoietici.

Di tutta questa serie di fenomeni, la degradazione di CXCL12 sembra rappresentare uno dei punti chiave dell'intero processo di mobilizzazione, in quanto conduce al rilascio delle cellule staminali dal legame con cellule stromali, osteoblasti e cellule endoteliali che costituiscono la nicchia emopoietica. Inoltre, la distruzione di questo ancoraggio produce l'interruzione dei segnali di quiescenza ed immobilità normalmente tradotti da CXCL12 in condizioni basali, con conseguente rimodellamento dell'intera nicchia.

L'effetto mobilizzante indotto dall'inversione del gradiente di CXCL12 è stato inoltre dimostrato sperimentalmente mediante l'iniezione di fucoidano, un polisaccaride solfato in grado di dislocare il CXCL12 dall'endotelio vascolare e dalla matrice extracellulare. Ulteriori evidenze sono emerse da studi condotti sull'AMD3100, un antagonista del recettore CXCR4. Una singola iniezione di AMD3100 è in grado di indurre una rapida mobilizzazione dei

progenitori emopoietici nel topo, così come nell'uomo. Il meccanismo molecolare alla base di questo effetto potrebbe risiedere nel legame dell'antagonista al recettore espresso da cellule staminali e progenitori emopoietici, oppure al recettore presente sulla superficie di cellule stromali, o entrambi i casi. Inoltre, è interessante notare come AMD3100 e G-CSF (quest'ultimo, il fattore di crescita più comunemente utilizzato per indurre mobilitazione emopoietica), sono in grado di influenzare questo fenomeno in modo sinergico, suggerendo l'attivazione di segnali additivi.

Pertanto, i dati di cui disponiamo al momento suggeriscono che l'innalzamento dei livelli di CXCL12 nel microambiente midollare, andando ad alterare l'equilibrio omeostatico del *reservoir* staminale, sia un pre-requisito per l'attivazione dei processi di mobilitazione. Ancora da chiarire rimane tuttavia quale sia il meccanismo biologico che prelude all'innalzamento della concentrazione di CXCL12. In altre parole, appurato che tale innalzamento si osserva in situazioni pato-fisiologiche di stress, danno cellulare e flogosi, qual è il meccanismo molecolare che traduce queste condizioni in un segnale regolatorio in grado di influenzare i livelli di CXCL12 o CXCR4? Parte della soluzione potrebbe risiedere in un fenomeno noto da tempo: a numerose condizioni di stress si associano situazioni ipossiche a livello locale o, in alcuni casi, estese anche a livello sistemico. In tali condizioni si assiste all'innalzamento dei livelli del fattore di trascrizione HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor – 1*) che si è mostrato in grado di agire legando specifiche sequenze di riconoscimento rinvenute anche nei geni codificanti per CXCL12 e CXCR4. Il modello attuale prevede pertanto che HIF-1 possa agire, a livello delle cellule endoteliali presenti nella regione ischemica, inducendo un incremento dei livelli di trascrizione ed espressione di CXCL12 e CXCR4, favorendo il reclutamento nella sede del danno di progenitori circolanti CXCR4-positivi. Un simile modello spiegherebbe, inoltre, l'esistenza di un meccanismo di riparazione intrinseco all'organismo, in grado di reclutare nelle sedi di danno tissutale cellule staminali o progenitori immaturi in grado di contribuire alla riparazione del danno stesso e alla rigenerazione del tessuto. L'esperienza clinica ci insegna tuttavia che tale capacità riparatrice, se esiste, è comunque limitata a danni di piccola entità ed è estremamente variabile in funzione del tessuto in considerazione. Scopo della medicina rigenerativa è quindi quello di studiare in dettaglio i meccanismi alla base dei processi

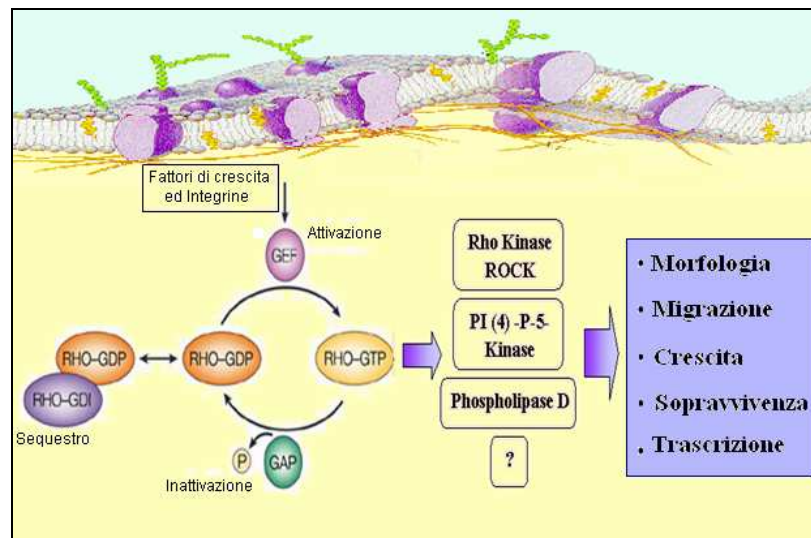
riparativi, con l'intento di potenziarli a livelli clinicamente significativi anche nelle situazioni di danno tissutale o d'organo più estese.

## V. LA FAMIGLIA DELLE Rho GTPasi

Uno dei fenomeni più rilevanti associati alla motilità cellulare guarda il riarrangiamento delle strutture citoscheletriche. A livello molecolare, tale fenomeno sembra essere in gran parte guidato dal reclutamento di piccole proteine monomeriche ad attività GTPasica, membri della famiglia delle RhoGTPasi. Questa famiglia comprende 22 sequenze geniche, codificanti per almeno 25 proteine diverse, le quali, in base al livello di similitudine della sequenza nucleotidica, della struttura tridimensionale e della funzione, vengono classificate in sei sottofamiglie distinte: Rac, RhoA, Cdc42, TC10 e TCL, Rnd, Rho BTB e Miro (37).

Analogamente a quanto noto da tempo per la proteina Ras, le proteine Rho sono “interruttori” molecolari, il cui stato funzionale cicla periodicamente da uno stato “inattivo”, legante guanosina difosfato (GDP), ed uno stato “attivo”, caratterizzato dal legame con guanosina trifosfato (GTP). Nella forma attiva, le proteine Rho sono in grado di legare un'ampia gamma di effettori o di molecole *target*, regolando in questo modo svariate attività cellulari (Figura 4).

L'attivazione delle RhoGTPasi dipende dall'azione di particolari proteine (note come *guanine nucleotide exchange factors*, *GEFs*), le quali sono a loro volta attivate da specifiche cinasi recettore-dipendenti. Il ripristino dello stato funzionale “inattivo” delle RhoGTPasi è invece affidato alle *GTPase activating proteins* (GAPs), le quali accelerano l'attività GTPasica intrinseca alle proteine Rho stesse, permettendo così l'idrolisi del legame fosforico e la conversione di GTP in GDP. In situazioni in cui si renda necessario il mantenimento delle RhoGTPasi in uno stato inattivo, entra in gioco un altro gruppo di proteine, le cosiddette *GDP dissociation inhibitors* (GDIs), che agiscono sequestrando o stabilizzando le proteine nella conformazione legante GDP (37).



**Figura 4.** La famiglia delle Rho GTPasi e suoi principali effettori.

I membri al momento meglio noti della famiglia delle Rho GTPasi sono Rac1, RhoA e Cdc42, la cui attività è stata studiata soprattutto in leucociti e fibroblasti. In queste cellule è stato dimostrato che l'attivazione di Rho induce polimerizzazione di filamenti di actina e miosina, mentre Rac e Cdc42 promuovono principalmente la formazione di protusioni citoplasmatiche, nonché di lamellipodi e filopodi (strutture contenenti actina). È stato inoltre dimostrato che l'attivazione delle Rho GTPasi è il fattore chiave per l'integrazione biomolecolare di stimoli provenienti dalla attivazione di recettori ad attività tirosinasi, di recettori per chemochine e molecole d'adesione.

### 1. Il ruolo delle Rho GTPasi nella regolazione del traffico di cellule staminali emopoietiche: homing, ritenzione e migrazione.

Molti degli stimoli ambientali, noti per svolgere un ruolo cruciale nella regolazione dell'*homing* midollare e della mobilitazione di cellule staminali emopoietiche, vengono integrati a livello

molecolare dall'azione delle Rho GTPasi. In particolare, il sottogruppo delle Rac GTPasi sembra essere il principale mediatore di questi fenomeni nelle cellule di origine emopoietica.

La sottofamiglia delle Rac GTPasi comprende tre proteine, altamente omologhe tra di loro: **Rac1**, espressa in modo ubiquitario; **Rac2**, la cui espressione é specifica per cellule di origine emopoietica; **Rac3**, altamente espressa nel sistema nervoso centrale e in molte linee cellulari. Il comune denominatore funzionale delle proteine Rac risiede, in particolare, nella capacità di agire come integratori molecolari di segnali generati da fattori di crescita, chemochine e molecole di adesione, quali le integrine. Tuttavia, l'inattivazione funzionale dei geni codificanti per le singole proteine Rac (come dimostrato di recente da studi in topi *knock out*) consente di far emergere attività biologiche del tutto peculiari.

L'assenza di Rac2, ad esempio, genera un'ampia gamma di alterazioni nei progenitori emopoietici, che comprendono anomalie nei processi di adesione e migrazione, entrambe riconducibili ad una anormale polimerizzazione dei filamenti di actina. Inoltre, l'attività di Rac2 sembra essere fondamentale per la ritenzione dei progenitori emopoietici nel microambiente midollare, in quanto la sua inattivazione funzionale si traduce in un'aumentata mobilizzazione e in un incremento nel numero di progenitori emopoietici circolanti.

L'attività di Rac1 sembra invece focalizzarsi sulla regolazione delle dinamiche di polimerizzazione dei filamenti di actina. Rac1 é inoltre fondamentale per garantire la localizzazione midollare di progenitori emopoietici dopo trapianto.

Infine, Rac3 potrebbe svolgere un importante ruolo nel promuovere fenomeni di adesione e disseminazione cellulare a distanza, come evidenziato da studi su diverse linee cellulari.

L'insieme di questi dati sembra perciò indicare le proteine Rac come principali regolatori a livello molecolare della mobilizzazione e dell'attecchimento di cellule staminali o progenitori emopoietici. Rimane tuttavia ancora da chiarire nel dettaglio quali siano le vie di trasduzione del segnale che vengono attivate a valle di Rac1, Rac2 e Rac3.



## VI. BIOLOGIA DEI NUCLEOTIDI EXTRACELLULARI

Il ruolo cardine dei nucleotidi purinici e pirimidinici in processi quali la sintesi degli acidi nucleici o il metabolismo energetico cellulare è ormai noto da decenni, ma solo recentemente sono emerse evidenze della loro azione nella regolazione di molteplici funzioni cellulari (38).

La prima dimostrazione della capacità dei nucleotidi extracellulari di intervenire nella modulazione di processi parafisiologici si deve agli studi di Druri e Szent-Gyorgi, dai quali emerse l'azione bradicardica e vasodilatatrice di queste sostanze. Queste prime osservazioni, che risalgono al 1929, rimasero tuttavia a lungo isolate, fino a quando il biochimico inglese G. Burnstock intraprese, all'inizio degli anni settanta, una serie di studi che sfociarono nella dimostrazione dell'inequivocabile ruolo dell'ATP extracellulare come neurotrasmettitore del sistema nervoso autonomo. Questi studi di Burnstock proseguirono fino alla dimostrazione, nel 1978, dell'esistenza di recettori di membrana specifici per i nucleotidi extracellulari (39, 40).

Le indagini svolte da Burnstock a livello del sistema nervoso diedero il via ad una serie di analisi più approfondite del ruolo dei nucleotidi extracellulari nei diversi distretti anatomici, che hanno portato, negli ultimi vent'anni, alla dimostrazione della capacità di queste molecole di agire, in una vasta gamma di tessuti, come regolatori della proliferazione e del differenziamento cellulare, del rilascio di citochine, della chemotassi, della formazione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto, della secrezione di fattori lisosomiali, nonché dell'induzione di apoptosi o necrosi cellulare, a seconda delle condizioni di stimolazione.

### 1. Sorgenti di nucleotidi extracellulari

I nucleotidi purinici e pirimidinici si trovano compartimentati nel citoplasma cellulare, dove assolvono le funzioni di sintesi degli acidi nucleici o partecipano al metabolismo energetico:

due funzioni chiave dalle quali dipende la sopravvivenza di qualsiasi cellula. Pertanto, in opportune condizioni, ogni cellula dell'organismo si può considerare, almeno a livello teorico, come una potenziale fonte di nucleotidi.

L'ATP si trova nel citoplasma cellulare alla concentrazione di 3-5 mM e può essere riversato nell'ambiente extracellulare mediante diversi meccanismi. Qualsiasi processo che porti alla morte cellulare per necrosi o all'induzione di danni strutturali alla membrana plasmatica può considerarsi come un fenomeno in grado di promuovere l'incremento della concentrazione extracellulare di nucleotidi purinici o pirimidinici. Una volta nell'ambiente esterno, i nucleotidi possono agire come mediatori di processi flogistici o come segnali della situazione di danno o di pericolo per quella particolare regione tissutale.

Oltre a queste situazioni di danno acuto, si può assistere al rilascio regolato di nucleotidi nei liquidi extracellulari, anche in assenza di lisi cellulare. In risposta a diversi stimoli (prevalentemente generati da situazioni di "pericolo", quali infiammazione, infezioni o morte cellulare), numerosi istotipi cellulari (macrofagi, cellule della microglia, linfociti T citotossici, piastrine, cellule endoteliali, nonché le terminazioni sinaptiche neuronali) possono rilasciare nucleotidi extracellulari per esocitosi di granuli secretori, oppure per trasporto passivo, mediato da trasportatori di membrana. L'identità di questi trasportatori rimane tuttavia controversa, anche se diversi studi sembrano suggerire che trasportatori della famiglia ABC (*ATP-Binding Cassette*) possano agire come trasportatori di ATP.

E' stato inoltre dimostrato in un'ampia varietà di tessuti che stimoli meccanici di varia natura (stiramento, rigonfiamento osmotico o anche un semplice cambio del terreno di cultura) possono indurre il rilascio di nucleotidi nei fluidi extracellulari. *In vivo* è stato dimostrato che cambiamenti di intensità del flusso sanguigno possono stimolare il rilascio di ATP da cellule endoteliali.

Il rilascio di altri nucleotidi, quali l'UTP, è rimasto a lungo poco documentato a causa della difficoltà sperimentali associate alla valutazione delle concentrazioni extracellulari dei nucleotidi pirimidinici. Tuttavia, grazie allo sviluppo di metodiche basate sulla conversione dell'UTP in UDP-glucosio, è stato possibile dimostrare analoghi meccanismi di rilascio anche per questo nucleotide, la cui concentrazione extracellulare può aumentare in seguito a lisi

cellulare o a stimolazione meccanica, attivando così circuiti di stimolazione autocrina e paracrina analoghi a quelli descritti per l'ATP.

## 2. Metabolismo dei nucleotidi extracellulari

A prescindere dal meccanismo di rilascio, una volta nell'ambiente extracellulare, i nucleotidi vengono in gran parte degradati da enzimi presenti ubiquitariamente sulla superficie esterna delle membrane cellulari (ectonucleotidasi), preposte alla degradazione di ATP ed UTP, nonché al controllo della loro concentrazione extracellulare. Accanto alle 5'-ectonucleotidasi, che catalizzano l'idrolisi di diversi nucleosidi 5'-monofosfati, sono stati recentemente identificate due famiglie di ectonucleotidasi, che con meccanismi diversi contribuiscono a terminare l'azione autocrina e paracrina dei nucleotidi rilasciati nei fluidi extracellulari.

I membri della prima famiglia, noti come **E-NTPDasi** o **CD39**, esibiscono un'attività ectopirasilica, che media l'idrolisi di nucleotidi 5'-trifosfati, così come di nucleosidi 5'-tri e difosfati. Sono stati descritti numerosi membri di questa famiglia, i cui nomi (CD39, CD39L1, CD39L2, ...) discendono direttamente dal marker linfocitario CD39, per il quale è stata infatti dimostrata un'attività ecto-ATP difosfoidrolasica.

Gli enzimi della seconda famiglia, chiamata **E-PDNP** (*ecto-phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase*), catalizzano la conversione di ATP in AMP e pirofosfato inorganico (Pi), di cAMP in AMP, nonché numerose altre reazioni ( $ATP \rightarrow ADP$ ;  $ADP \rightarrow AMP$ ;  $AMP \rightarrow$  Adenosina).

I membri di entrambe le famiglie enzimatiche sono proteine integrali di membrana, ma forme solubili di questi enzimi possono essere rilasciate nell'ambiente extracellulare in seguito a tagli proteolitici.

Sono inoltre stati descritti altri enzimi, quali un'ecto-nucleoside difosfocinasi, che catalizza la reazione  $ATP + UDP \rightarrow ADP + UTP$  e che potrebbe pertanto giocare un ruolo importante nel metabolismo dei nucleotidi extracellulari, sia purinici che pirimidinici (39, 40).

Una parte dei nucleotidi rilasciati sfugge tuttavia alla degradazione mediata dalle ectonucleotidasi e può così legare recettori di membrana della famiglia P2, la cui attivazione innesca molteplici effetti biologici (come precedentemente accennato) nelle cellule bersaglio.

Sono quindi diverse le caratteristiche che contribuiscono ad indicare i nucleotidi come importanti molecole di segnale a livello extracellulare:

- rilascio regolato e mediato da specifici trasportatori;
- esistenza di recettori di membrana, specifici per i nucleotidi;
- degradazione mediata da diversi enzimi, che contribuiscono a regolarne finemente la concentrazione extracellulare e a terminarne l'azione.

## VII. NUCLEOTIDI EXTRACELLULARI E RECETTORI P2

Dal punto di vista della nomenclatura, si distinguono due principali famiglie di recettori per le purine, distinti sia dal punto di vista molecolare, che farmacologico, specificatamente preposti al legame di nucleotidi presenti nell'ambiente extracellulare (40):

- **Recettori P1**, specifici per l'Adenosina. Fanno parte di questa famiglia quattro isoforme recettoriali (A1, A2A, A2B e A3) tutte appartenenti al gruppo dei recettori a sette domini transmembrana e associati a proteine G eterotrimeriche. Questi recettori sono stati studiati, in particolare, nel sistema nervoso, nelle cellule immunitarie e nelle piastrine, dove sembrano essere attivati in risposta a condizioni di stress metabolico (47).
- **Recettori P2**, in grado di legare i nucleotidi extracellulari, sia purinici (ATP, ADP), che pirimidinici (UTP, UDP)

Il presente studio verte esclusivamente sull'analisi dei recettori della famiglia P2.

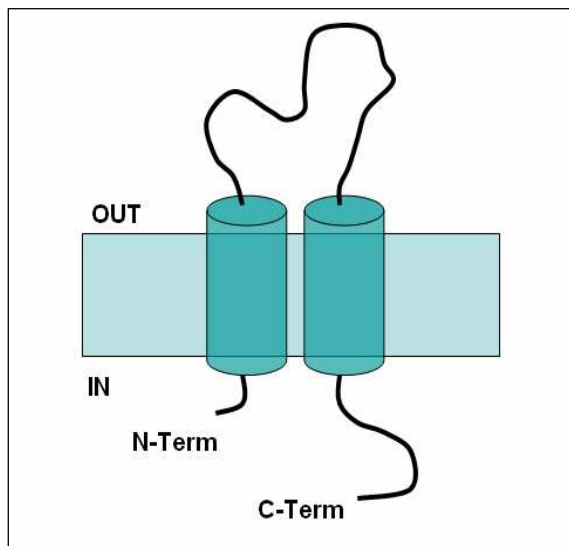
Dalla prima descrizione nel 1978 ad opera di Burnstock sono stati clonati e caratterizzati, sia farmacologicamente e che molecolarmente numerosi membri recettoriali della famiglia P2, responsabili del legame di nucleotidi extracellulari e in grado di mediarne l'azione biologica.

La famiglia recettoriale P2 è a sua volta suddivisa, su basi molecolari, in due sottogruppi: recettori P2Y e recettori P2X.

### **1. Recettori P2X**

La prima sequenza genica codificante per un recettore P2X è stata identificata nel 1994 e attualmente i geni codificanti per subunità recettoriali appartenenti a questa famiglia sono sette. La sequenza dei geni P2X contiene fino a tredici esoni, per i quali diverse forme di *splicing* alternativo sono state descritte (41).

Strutturalmente, ogni subunità contiene due domini idrofobici transmembrana, le cui estremità NH<sub>2</sub> e COOH protrudono entrambe nel citoplasma cellulare (Figura 5). Tali subunità si assemblano, in numero di tre o sei, per formare la struttura recettoriale vera e propria, che si può presentare in forma di omo- o etero-oligomeri. Eccettuato il recettore P2X<sub>7</sub>, le cui subunità sembrano consentire la sola formazione di omodimeri, tutte le altre subunità presentano una più o meno ampia attitudine al co-assemblaggio eterologo. Ad esempio, subunità P2X<sub>1</sub> possono formare la molecola recettoriale interagendo con subunità P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>5</sub> e P2X<sub>6</sub>.



**Figura 5.** I dati a disposizione indicano che ciascuna subunità dei recettori P2X comprende due domini idrofobici transmembrana, connessi da un ampio *loop* extracellulare, ricco in residui di cisterna e con due siti di glicosilazione. Le estremità ammino- e carbossi-terminali si trovano entrambe sul versante citoplasmatico della membrana.

L'assemblaggio delle subunità P2X porta infine alla formazione di recettori-canali transmembrana, la cui apertura regola selettivamente il passaggio di cationi  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ . L'apertura di questi canali è regolata dal legame con ATP che, a differenza di quanto si vedrà per i recettori P2Y, rappresenta l'unico ligando specifico per i recettori P2X (43, 44).

Le proprietà funzionali di questi recettori-canale sono state studiate in dettaglio nell'omooligomero P2X<sub>2</sub>, che è in grado di legare, in modo positivamente cooperativo, fino a tre molecole di ATP. Le analisi biochimiche mostrano che l'apertura del canale P2X<sub>2</sub> avviene solo quando tutti e tre i siti di legame per l'ATP sono stati occupati. È interessante notare che i recettori P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> e, soprattutto, P2X<sub>7</sub> presentano una bassa permeabilità a cationi quando la stimolazione con ATP è di breve durata, ma aumenta in modo significativo se il legame si prolunga, convertendo il canale in un vero e proprio poro, che consente un massiccio movimento ionico attraverso la membrana. È stato inoltre dimostrato che la formazione del poro P2X<sub>7</sub> è di fondamentale importanza per il rilascio di IL-1 $\beta$ , un mediatore chiave della risposta immunitaria. Nel caso in cui la stimolazione con ATP venga terminata, il poro è tuttavia reversibile e può tornare alle dimensioni abituali; al contrario, se la stimolazione si prolunga ulteriormente, lo squilibrio ionico che ne consegue può portare la cellula a morte per

lisi osmotica. Rimane tuttavia ancora da chiarire se la conversione da canale selettivo a poro sia una proprietà intrinseca al recettore o se richieda l'ausilio di una o più proteine accessorie. Un ulteriore accenno merita il recettore P2X<sub>7</sub> che, oltre alle funzioni di canale e di poro, si distingue dagli altri membri della famiglia per la presenza di una coda citoplasmatica particolarmente lunga, in grado di interagire con numerose proteine citoplasmatiche, tra cui la  $\beta$ -actina, la laminina  $\alpha 3$  e la fosfatidilinositolo 4-cinasi. L'attivazione di queste vie di trasduzione del segnale é presumibile che influenzi le dinamiche di riarrangiamento del citoscheletro, nonché la formazione delle protusioni di membrana, che si osservano in seguito alla stimolazione con ATP (42).

## 2. Recettori P2X: ruoli fisiologici

La famiglia dei recettori P2X, nelle sue diverse isoforme recettoriali, é distribuita a livello tissutale in modo praticamente univocitario. Nonostante molte isoforme siano state clonate da tessuti eccitabili, studi di *knockout* genico hanno permesso di chiarificare l'attività fisiologica di molte isoforme recettoriali P2X e il loro impatto sull'attività funzionale dei tessuti.

Il risultato di questi studi é riassunto nella seguente tabella (modificata da Boeynaems J-M et al., "Overview of the P2 receptors").

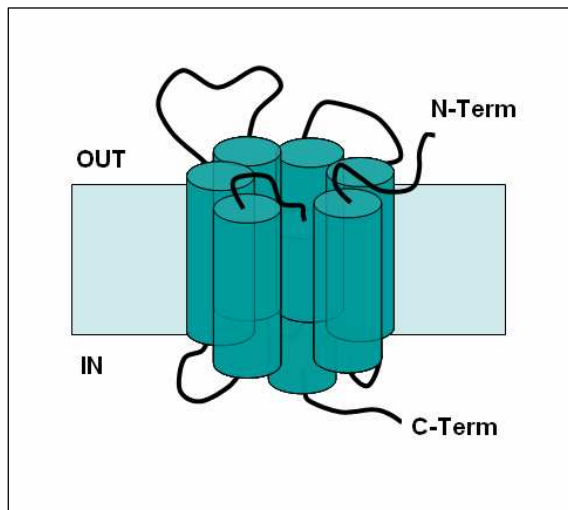
	Agonista	Fenotipo in topi <i>knockout</i>
P2X <sub>1</sub>	ATP	Ridotta contrazione dei vasi deferenti; infertilità maschile; ridotta vasocostrizione da stimolazione nervosa; ridotta capacità autoregolatoria del flusso ematico a livello renale.
P2X <sub>2</sub>	ATP	Ridotta risposta ventilatoria in seguito ad ipossia.
P2X <sub>3</sub>	ATP	Ridotta riflesso urinario; alterata risposta a stimoli dolorifici.
P2X <sub>4</sub>	ATP	
P2X <sub>7</sub>	ATP	Ridotta produzione di citochine e ridotta capacità, ATP-mediata, di uccidere micobatteri da parte di macrofagi. Alterata formazione e riassorbimento ossei.

### 3. Recettori P2Y

Recenti indagini biochimiche hanno mostrato che recettori analoghi al gruppo P2Y sono apparsi molto precocemente nel corso dell'evoluzione, a sostegno dell'ipotesi che le vie di segnalazione purinergica e pirimidinergica siano tra i più antichi meccanismi di comunicazione intercellulare.

Uno dei più primitivi recettori P2Y, studiato in *Raja erinacea*, non è in grado di discriminare tra ATP, ADP e UTP; nel corso dell'evoluzione si sono tuttavia evoluti diversi sottotipi, caratterizzati da una maggiore specificità di legame e da una peculiare distribuzione tissutale.

I recettori P2Y (Figura 6) oggi noti vengono classificati nel più ampio gruppo dei recettori GPCR (*G-protein coupled receptors*), il cui capostipite è il recettore per la Rodopsina, caratterizzati da una tipica struttura a sette eliche transmembrana: il dominio amminotermine si affaccia sul versante extracellulare, mentre la coda carbossiterminale protrude nel citoplasma cellulare, per interagire con le proteine G che iniziano la cascata trasduzionale del segnale (45, 46).



**Figura 6.** Recettori P2Y: struttura a sette eliche transmembrana.

Il primo recettore appartenente alla famiglia P2Y è stato clonato nel 1993. Da allora, numerosi altri membri della famiglia sono stati isolati e clonati. Attualmente sono noti nell'uomo otto recettori P2Y, suddivisi, sulla base di caratteristiche strutturali, in due sottogruppi:



- **Gruppo A:** i recettori appartenenti a questo gruppo condividono la presenza del motivo Y-Q/K-X-X-R nel settimo dominio transmembrana (TM7). Ne fanno parte i recettori P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub> e P2Y<sub>11</sub>.
- **Gruppo B:** in cui il dominio TM7 si caratterizza per la presenza del motivo K-E-X-X-L. Appartengono a questo gruppo le isoforme P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> e P2Y<sub>14</sub>.

Per inciso, i numeri mancanti nella classificazione corrispondono a recettori per i quali non esiste un ortologo nei mammiferi o a recettori analoghi ai P2Y ma per i quali rimane da dimostrare la responsività a nucleotidi extracellulari.

#### 4. Recettori P2Y: proprietà funzionali

Le attività biologiche mediate da recettori P2Y sono numerosissime ed ubiquitariamente distribuite in tutti i tessuti. Tuttavia, lo sviluppo di topi *knock-out* ha consentito negli ultimi anni di identificare alcune delle funzioni biologiche sulle quali i nucleotidi extracellulari svolgono un concreto ruolo fisio-patologico.

##### 1. *Aggregazione piastrinica*

L'attivazione piastrinica, cui si assiste in caso di danni all'endotelio vascolare, si caratterizza per il rilascio di mediatori (Trombossano A<sub>2</sub> e nucleotidi) compartimentalizzati ad alte concentrazioni nei granuli densi delle piastrine. I nucleotidi rilasciati (in particolare ADP ed ATP) innescano, con un meccanismo a *feedback* positivo, un circuito di stimolazione paracrina, attraverso l'attivazione dei recettori P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>12</sub> e P2X<sub>1</sub>. L'importanza dei nucleotidi nel promuovere e mantenere l'attivazione piastrinica é confermata da modelli di *knock-out* murini, in cui la mancata espressione dei recettori P2Y<sub>1</sub> o P2Y<sub>12</sub> si associa ad alterazioni dell'aggregazione piastrinica e aumento del tempo di sanguinamento (48).

## 2. *Secrezione di ioni cloro da parte di tessuti epiteliali*

I recettori P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>4</sub> sono stati identificati come regolatori della secrezione di ioni cloro da parte di tessuti epiteliali, fenomeno che si associa fisiologicamente al controllo dell'idratazione e lubrificazione delle mucose. Sono attualmente in corso *trials* clinici con agonisti dei recettori P2Y<sub>2</sub> e P2Y<sub>4</sub> per il trattamento di patologie, quali fibrosi cistica, bronchite cronica e, in oftalmologia, per la sindrome da secchezza oculare (45).

## 3. *Recettori P2 e cancro*

Studi recenti hanno inoltre contribuito a mettere in luce un potenziale ruolo dell'ATP e di altri nucleotidi extracellulari nel trattamento di certe forme neoplastiche. Diversi sottotipi recettoriali P2 sono stati identificati in diversi tessuti neoplastici, sia in linee cellulari, che in tessuti primari di origine umana. Tale osservazione acquisisce particolare interesse alla luce della crescente mole di dati che, negli ultimi anni, ha dimostrato il coinvolgimento dei nucleotidi extracellulari nei processi di apoptosi, differenziamento e proliferazione cellulare.

La prima dimostrazione che l'ATP è in grado di svolgere un'attività anti-cancro risale al 1993, ad opera di Rapaport. In questi esperimenti *in vivo* cellule tumorali sono state inoculate in topi, che, successivamente, hanno ricevuto somministrazioni sistemiche di ATP. Questo approccio ha dimostrato che la somministrazione intraperitoneale giornaliera di ATP (in assenza di ulteriori farmaci) è in grado, nel modello murino, di diminuire significativamente la crescita tumorale, di prolungare il tempo di sopravvivenza e di limitare l'insorgenza di stati cachettici (49). Ulteriori esperimenti hanno inoltre dimostrato effetti di cooperazione sinergica tra ATP e chemio- o radio-terapia.

Sono state fatte diverse ipotesi sul meccanismo attraverso cui l'ATP può svolgere l'attività antitumorale:

1. Attività farmacologica diretta sui recettori P2;
2. Attività farmacologica indiretta, dovuta alla degradazione dell'ATP in Adenosina, con conseguente attivazione dei recettori P1;

3. Effetto nutrizionale: la somministrazione di ATP *in vivo* determina un'espansione delle riserve intracellulari di ATP sia negli eritrociti, che negli epatociti. Pertanto, non si può escludere che l'effetto antitumorale (in particolare l'effetto anti-cachettico) sia, almeno in parte, conseguenza di questo incremento dell'ATP intracellulare (effetto metabolico e nutrizionale), piuttosto che dall'interazione dei nucleotidi extracellulari con recettori P2 (effetto farmacologico).

Per quanto riguarda i tumori ematologici, i dati a disposizione sono ancora scarsi. E' stata tuttavia dimostrata l'espressione di recettori P2X<sub>7</sub> e P2Y<sub>11</sub> in cellule di pazienti con leucemia linfatica cronica e nella linea cellulare HL-60. In particolare, si ritiene che in queste cellule la stimolazione del recettore P2X<sub>7</sub> le induca a morte, mentre l'attivazione di P2Y<sub>11</sub> ne stimoli l'attività differenziativa.

L'effetto antitumorale dei nucleotidi extracellulari é stato inoltre testato *in vitro* in numerosi tumori solidi; recentemente, sono stati attivati *trials* clinici nell'uomo (in pazienti affetti da tumore polmonare a piccole cellule) che hanno dimostrato la buona tollerabilità dell'ATP come farmaco e una certa attività terapeutica, soprattutto nel limitare la perdita di peso e l'insorgenza di stati cachettici gravi. Sebbene ulteriori studi siano indubbiamente necessari, questi dati preliminari aprono la strada a nuove strategie terapeutiche basate, ad esempio, sulla combinazione di nucleotidi extracellulari e trattamenti chemioterapici o radioterapici.

## VIII. NUCLEOTIDI EXTRACELLULARI E SISTEMA EMOPOIETICO

Nonostante gli studi di Burnstock abbiano contribuito a focalizzare per molto tempo l'attenzione dei ricercatori sui tessuti neuronali, a partire dagli anni ottanta hanno preso il via diversi studi volti a caratterizzare la distribuzione dei recettori P2 anche in altri tessuti. Da tali ricerche è emerso che, accanto a numerosi altri isotipi, il sistema emopoietico è anch'esso bersaglio dell'azione modulatoria dei nucleotidi extracellulari. In particolare, ATP, ADP, UTP

ed UDP sembrano giocare un ruolo importante soprattutto nella regolazione di processi flogistici ed immunitari, nonché nel controllo di proliferazione e differenziamento di diversi *lineages* emopoietici.

### 1. Recettori P2 e modulazione di processi proliferativi e differenziativi

L'analisi del profilo di espressione dei recettori P2Y da parte di cellule del sistema emopoietico ha contribuito a rivelare l'inaspettato coinvolgimento di nucleotidi extracellulari nella modulazione di processi proliferativi e maturativi, lungo le diverse filiere differenziative (38, 50, 51).

Ad esempio, è emerso che progenitori megacariocitari, eritroidi e mieloidi acquisiscono peculiari attività funzionali proprio in risposta a stimolazione con ATP, ADP ed UTP. Il caso del recettore P2Y<sub>2</sub> è esemplificativo di questo fenomeno nei precursori mieloidi; questo recettore viene infatti espresso lungo tutto il processo differenziativo, da mieloblasto a neutrofilo maturo, a livello del quale partecipa poi alla regolazione di funzioni specializzate, come la migrazione chemiotattica, la produzione di ioni superossido o la degranolazione.

L'espressione del recettore P2Y<sub>11</sub> sembra invece costituire una peculiarità dei progenitori più immaturi, soprattutto nella linea granulocitaria, dove la stimolazione di questo recettore produce alterazioni fenotipiche, caratteristiche del processo differenziativo (54).

Come mostrato da Schnurr et al., la stimolazione di questo recettore in cellule dendritiche è inoltre in grado di favorire, in sinergia con TNF $\alpha$ , la maturazione di monociti a cellule dendritiche, oltre che incrementare l'espressione di recettori per chemochine e la secrezione di citochine come l'IL-1 $\beta$ .

Per quanto riguarda i progenitori megacariocitari ed eritroidi, il profilo di espressione dei recettori P2Y sembra suggerire una selettiva responsività di queste cellule ai soli UTP ed ADP. Seppure il ruolo fisiologico di questi recettori rimanga ancora da chiarire, è tuttavia interessante notare come, lungo il percorso differenziativi, le cellule appartenenti a queste due

filiera emopoietiche vadano progressivamente incontro ad una *down-regulation* dei recettori responsivi all'UTP, suggerendo, per questo nucleotide, un ruolo ristretto al compartimento dei progenitori più immaturi.

Ancora in gran parte da chiarire è invece il ruolo dei nucleotidi extracellulari nella filiera linfoide: i dati pubblicati fino ad ora, seppure scarsi, sembrano tuttavia suggerire che, anche in questo ramo del differenziamento emopoietico, l'espressione dei diversi recettori P2Y cambi consensualmente allo stato differenziativo o al coinvolgimento in quadri patologici.

Interessante è inoltre il ruolo del recettore P2X<sub>7</sub> nella regolazione dei processi proliferativi linfoidi; l'espressione di questo recettore sembra infatti conferire, almeno *in vitro*, un notevole vantaggio selettivo alle cellule linfoidi in culture prive di siero. Inoltre, è stato dimostrato che i linfociti stessi sono in grado di rilasciare nell'ambiente extracellulare grandi quantità di ATP, consentendo l'instaurarsi di circuiti di stimolazione autocrina e paracrina di fenomeni mitogeni e proliferativi, i quali potrebbero giocare un ruolo chiave anche in contesti patologici.

## 2. Recettori P2 ed effetti citotossici

Le prime evidenze dell'azione citotossica dei nucleotidi extracellulari risalgono alla metà degli anni Ottanta, quando Steinberg e Silverstein descrissero per primi la possibilità di indurre a morte diverse tipologie cellulari attraverso una sostenuta stimolazione con ATP.

A questo primo studio ne sono seguiti altri, dai quali è emerso che esistono invece anche cellule, come i linfociti T citotossici e le cellule LAK, le quali sono costitutivamente resistenti all'azione citotossica dell'ATP. In un primo momento, questa resistenza fu attribuita alla maggiore attività degli enzimi di membrana, le ectonucleotidasi, preposti alla degradazione dei nucleotidi extracellulari. Tuttavia, in un secondo tempo, emerse che la caratteristica peculiare delle cellule resistenti risiedeva piuttosto nella carente o mancata espressione di particolari recettori P2X. In particolare, i recettori P2X<sub>4</sub> e P2X<sub>7</sub> sembrano essere i sottotipi principalmente coinvolti nella trasduzione del segnale citotossico (38).

E' stato inoltre osservato che la trasduzione del segnale citotossico può avvenire con modalità diverse a seconda del tempo di stimolazione con ATP: ad esempio, stimolazioni prolungate nel tempo, si traducono in morte cellulare per necrosi, secondaria a lisi osmotica. Al contrario, la stimolazione intermittente con ATP conduce all'attivazione di fenomeni apoptotici, con associati i caratteristici fenomeni di frammentazione del DNA, flussi ionici transmembrana e formazione di corpi apoptotici.

A riprova di ciò è stata inoltre dimostrata la capacità dell'ATP di indurre nelle cellule dendritiche l'attivazione dell'enzima ICE (*IL-1 $\beta$  converting enzyme*), appartenente alla classe delle caspasi, proteine coinvolte nella trasduzione del segnale apoptotico (52).

Queste osservazioni avvalorano l'ipotesi che la citotossicità indotta da nucleotidi extracellulari, mediata dalla perturbazione dell'equilibrio osmotico o dall'attivazione di caspasi, possa giocare un ruolo chiave nei meccanismi di difesa immunitaria (53).

Blanchard et al. hanno proposto che l'attivazione dei recettori P2X, la cui espressione aumenta nelle cellule presentanti l'antigene attivate, intervenga con meccanismi a *feedback* negativo nello spegnimento della risposta immune (eliminando così macrofagi e linfociti T attivati) e nel regolare la selezione timica del corredo di linfociti T non responsivi agli antigeni *self*.

#### 4. Recettori P2 nei processi flogistici ed immunitari

La capacità dei nucleotidi extracellulari di influenzare il comportamento di cellule del sistema immunitario sta emergendo come uno dei fenomeni più rilevanti nell'ambito della biologia dei recettori P2., i quali vengono ora visti come componenti essenziali delle *sinapsi immunologiche*. Questo termine, inizialmente coniato per descrivere il *cross-talk* tra cellule presentanti l'antigene e linfociti T, si è oggi esteso a tutte le complesse interazioni necessarie per l'allestimento di una efficiente risposta immunitaria e che coinvolgono leucociti, macrofagi, cellule endoteliali ed epiteliali.

In particolare, i nucleotidi extracellulari rilasciati in grandi quantità dalle cellule lisate, andrebbero ad agire come segnali di una situazione di pericolo per l'organismo, innescando circuiti autocrini e paracrini di stimolazione della risposta immune. A conferma di questa ipotesi va il numero sempre crescente di cellule del sistema immunitario che risulta esprimere recettori P2 e la cui funzionalità è influenzata dalla attivazione di questi recettori.

La modulazione dei meccanismi di difesa da parte di nucleotidi extracellulari sembra richiedere l'attivazione sinergica di recettori P2Y e P2X, che cooperano nell'allestire un'efficiente risposta immunitaria. I recettori P2Y, come già illustrato, andrebbero a regolare i fenomeni di proliferazione, differenziamento e chemiotassi di cellule immunitarie, mentre i recettori P2X agirebbero prevalentemente nella trasduzione di segnali citotossici.

In particolare, l'attivazione del recettore P2X<sub>7</sub>, oltre che nella formazione di pori transmembrana, sembra essere coinvolto nella trasduzione di numerose risposte immunitarie, quali la fusione di macrofagi (importanti per la formazione di granulomi), l'uccisione di parassiti endocellulari, la presentazione dell'antigene da parte di cellule dendritiche, oltre che la secrezione di citochine attivatorie, come l'IL-1 $\beta$  nella forma biologicamente attiva. .

## **IX. TRASDUZIONE DEL SEGNALE ATTIVATO DA RECETTORI P2**

La trasduzione del segnale attivata dai recettori P2X sembra, nel complesso, seguire meccanismi piuttosto semplici e lineari. In seguito al legame con l'ATP, i recettori-canale P2X si aprono, generando un movimento di cationi attraverso la membrana cellulare. Tale movimento di ioni produce cambiamenti nel potenziale elettrico della cellula, con depolarizzazione della membrana che, a sua volta, attiva canali per il calcio voltaggio-dipendenti. L'accumularsi di ioni calcio nel citoplasma cellulare é infine responsabile dell'attivazione di numerose cascate del segnale, attraverso l'attivazione di MAPKs, PKC e calmodulina (56, 57).

La trasduzione del segnale attivata da recettori P2Y sembra invece avvenire secondo vie più complesse, che vedono il reclutamento di proteine G, fosfolipasi, proteine cinasi, fosfodiesterasi, nonché adenilato- e guanilato-ciclastasi. La complessità della cascata trasduzionale del segnale si traduce poi in un effetto ad ampio spettro su numerose funzioni cellulari, quali proliferazione, apoptosi, metabolismo, attività secretoria e migrazione cellulare. Come osservato per molti altri membri della super-famiglia GPCR, anche la stimolazione dei recettori P2Y produce l'attivazione di proteine G eterotrimeriche e la loro conseguente dissociazione nelle subunità  $\alpha$  e  $\beta\gamma$ , a loro volta in grado di interagire con una variegata gamma di *target* cellulari. In particolare, ciascun sottotipo recettoriale P2Y è stato inoltre associato ad una o più sottofamiglie di proteine G ( $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$ ,  $G_{12/13}$ ). Ad esempio, per il sottotipo P2Y<sub>2</sub>, è stata descritta la capacità di accoppiarsi a proteine della famiglia  $G_{i/o}$ ,  $G_{q/11}$  o  $G_{12}$ .

Ulteriore variabilità alla risposta è data dall'abilità dei recettori P2Y di interagire anche con proteine G monomeriche. Ad esempio, il recettore P2Y<sub>2</sub> può attivare, oltre alle proteine G eterotrimeriche già citate, anche le proteine Rac e RhoA.

Rimangono ancora da chiarire i meccanismi che consentono a ciascun sottotipo P2Y di associare la propria attivazione a diverse proteine G e a molteplici vie di trasduzione del segnale. Una possibile spiegazione potrebbe essere la seguente: molti dei recettori P2Y presentano specificità di legame per più di un nucleotide ed è plausibile supporre che il legame di diversi nucleotidi alla stessa molecola recettoriale induca stati conformazionali distinti, in grado di interagire con proteine G diverse. Ad esempio, il recettore P2Y<sub>11</sub>, può legare sia ATP che UTP, ma la sua attivazione porta nei due casi a risposte trasduzionali diverse, coinvolgenti l'adenilato ciclastasi e la PLC (nel caso dell'ATP) o la mobilitazione intracellulare di ioni calcio, nel caso in cui la stimolazione avvenga con UTP (57, 59).

Questi dati contribuiscono a sottolineare ciò che, nel corso degli ultimi dieci anni, è divenuto sempre più evidente, vale a dire che il classico meccanismo di trasduzione del segnale attivato da recettori GPCR non è così semplice e lineare come ritenuto in principio.

Numerosi studi hanno messo in luce l'esistenza di un complesso "*cross-talk*" non solo tra i diversi recettori GPCR e i loro effettori, ma anche tra recettori GPCR e canali ionici, integrine



e recettori tirosin-cinasici. In particolare, la “comunicazione” tra recettori P2Y ed integrine sembra svolgere un ruolo nell'accoppiare recettori P2Y a proteine G coinvolte nella migrazione cellulare. Ad esempio, il recettore P2Y<sub>2</sub> contiene una sequenza-consenso (RGD) per il legame di integrine, localizzata nel primo *loop* extracellulare: tale sequenza faciliterebbe l'interazione di P2Y<sub>2</sub> con le integrine  $\alpha_V\beta_3$  e  $\alpha_V\beta_5$ . Recentemente è stato poi dimostrato che l'espressione dell'integrina  $\alpha_V$  è indispensabile a P2Y<sub>2</sub> per attivare la risposta migratoria, consentendo il reclutamento di G<sub>0</sub>, Rac e Vav2 (RacGEF). L'importanza di questo *cross-talk* emerge ulteriormente se si considera il ruolo chiave che le integrine svolgono in un'ampia gamma di attività cellulari, come proliferazione, differenziamento, apoptosi e migrazione cellulare. Le integrine sono proteine di adesione che vengono attivate dal legame con componenti della matrice extracellulare. In seguito ad attivazione, molti tipi di integrine tendono a raggrupparsi e a reclutare proteine citoscheletriche e citoplasmatiche che, nell'insieme, costituiscono le cosiddette adesioni focali. Questi complessi, non soltanto assolvono la funzione di legame fisico tra componenti intracellulari ed extracellulari, ma sono anche importanti siti di coordinamento della trasduzione del segnale generato da integrine ed altri recettori di membrana.

Riassumendo, la comprensione dettagliata dei meccanismi che presiedono alla trasduzione del segnale attivata da recettori P2Y non può prescindere dallo studio ad ampio spettro delle interazioni che tali recettori ingaggiano con altri recettori GPCR, con canali ionici e molecole di segnale, oltre che con proteine di adesione, strutture citoscheletriche e componenti della matrice extracellulare. Queste interconnessioni molecolari hanno infatti non soltanto la capacità influenzare la cascata intracellulare del segnale, ma spiegano anche come ciascun recettore P2Y possa rispondere in modi diversi a seconda del repertorio molecolare espresso, in un preciso istante, da un determinato istotipo cellulare.

Questo tipo di visione è senz'altro destinata a rivoluzionare la comprensione non soltanto dell'attività biomolecolare a valle dei recettori P2, ma anche dell'intero “essere-cellula”, inteso non più come il mero aggregato di compartimenti molecularmente separati, ma come un insieme di componenti interdipendenti e finemente coordinate, nell'allestimento di risposte a stimoli provenienti dall'ambiente esterno.

## X. NUCLEOTIDI EXTRACELLULARI E MIGRAZIONE CELLULARE

Nel corso degli ultimi dieci anni la letteratura scientifica nel campo della biologia dei nucleotidi extracellulari si è arricchita di numerosi studi, i quali hanno contribuito a delucidare il ruolo di queste molecole come mediatori della comunicazione intercellulare e di fenomeni di migrazione e chemiotassi.

Nell'ambito del sistema nervoso, è stata ad esempio dimostrata (grazie a studi condotti soprattutto nel ratto) la capacità di ATP, ADP ed UTP di regolare la migrazione di progenitori oligodendrocitari. Inoltre, l'attivazione dei recettori P2Y, attraverso il *cross-talk* con recettori integrinici, sembra essere coinvolta anche nella chemiotassi astrocitaria, come evidenziato da studi svolti sia in linee di astrocitoma, sia in astrociti primari di ratto (60, 61).

Risultati analoghi sono stati ottenuti studiando la risposta di cellule mesangiali renali ad ATP ed UTP. La stimolazione dei recettori P2 ha generato in queste cellule risposte proliferative e migratorie; queste ultime sembrano essere strettamente correlate (almeno in questo modello) alla comunicazione crociata tra recettori P2 ed il recettore per la Sfingosina-1-fosfato, un altro mediatore non peptidico recentemente caratterizzato.

Per quanto riguarda il sistema emopoietico, sono numerosi gli esempi di cellule il cui profilo migratorio può venire modulato da nucleotidi extracellulari. Si tratta prevalentemente di cellule preposte alla difesa dell'organismo, attraverso l'allestimento di risposte flogistiche o immunitarie, quali neutrofilo, monociti, mastociti, eosinofili e cellule dendritiche (62-64).

Verghese et al. (65) sono stati tra i primi a dimostrare che ATP, ATP $\gamma$ S ed UTP producono in neutrofilo umano e in cellule della linea HL60 un incremento della mobilizzazione intracellulare di ioni calcio e risposte chemiotattiche, associate a riarrangiamenti citoscheletrici e polimerizzazione intracellulare dei filamenti di actina.

Le dinamiche della chemiotassi guidata da nucleotidi extracellulari sono recentemente approdate alle pagine della prestigiosa rivista *Science* grazie ad uno studio in cui Chen e colleghi

(63) mostrano che i neutrofili umani secernono ATP a livello del fronte cellulare di migrazione. L'ATP secreto, con un meccanismo di stimolazione autocrina, contribuirebbe poi a promuovere ed amplificare la migrazione dei neutrofili e la loro risposta a gradienti chemioattrattivi.

Un altro interessante capitolo della migrazione guidata da nucleotidi extracellulari riguarda le cellule dendritiche (66, 67). Questa popolazione cellulare gioca un ruolo chiave nell'allestimento della risposta immunitaria, grazie alla capacità di migrare nei tessuti periferici e negli organi linfoidi, di processare gli antigeni e di attivare cellule T *naïve*. Come evidenziato da diversi studi, la stimolazione con nucleotidi extracellulari produce una potente risposta chemiotattica in cellule dendritiche immature, accompagnata da incrementi nella concentrazione citosolica di ioni calcio e nei livelli di polimerizzazione intracellulare dei filamenti di actina. E' inoltre interessante notare che, sebbene cellule dendritiche immature e mature esprimano livelli paragonabili delle diverse isoforme di recettori P2, soltanto le prime rispondono con significative risposte migratorie alla stimolazione con nucleotidi extracellulari (66). Questo lascia presupporre che l'attività modulatoria dei nucleotidi si espliciti principalmente nelle fasi precoci della risposta immunitaria, facendo di queste molecole una famiglia chiave di immunomodulatori, potenzialmente sfruttabile anche dal punto di vista farmacologico.

Un'altra classe di cellule immunitarie il cui comportamento migratorio è influenzato da nucleotidi extracellulari è quella di monociti e macrofagi.

I monociti umani esprimono infatti diverse isoforme recettoriali appartenenti sia alla famiglia P2Y che P2X, la cui attivazione si traduce in riarrangiamenti del citoscheletro cellulare e promozione della motilità. Studi più approfonditi hanno tuttavia mostrato che, nei monociti, i nucleotidi extracellulari sembrano promuovere la migrazione non-direzionale di queste cellule, piuttosto che una vera e propria risposta chemiotattica verso un preciso gradiente chemioattrattivo. Ciò non toglie che l'ATP svolga un ruolo importante nel promuovere fenomeni migratori come molecola-segnaletto di stati infiammatori o di danni tissutali (68).

Meritano infine un accenno altre due popolazioni cellulari (quella delle cellule endoteliali e quella delle cellule muscolari lisce), il cui comportamento migratorio sembra essere sensibilmente influenzato da nucleotidi extracellulari (69, 70).

Studi condotti su cellule endoteliali umane di cordone ombelicale (note come cellule HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) hanno evidenziato che ATP ed UTP possono modulare una varietà di risposte biologiche associate alla migrazione, quali incremento di ioni calcio, riarrangiamenti del citoscheletro, fosforilazione delle adesioni focali, incremento dell'adesione cellulare e, appunto, chemiotassi.

Come accennato, effetti analoghi sono stati osservati in cellule muscolari lisce, in cui la stimolazione con nucleotidi extracellulari (in particolare con UTP) promuove sia risposte proliferative, che chemiotattiche.

Alla luce di queste osservazioni in cellule endoteliali e muscolari lisce, e di quanto noto sul ruolo dei nucleotidi nel promuovere l'aggregazione piastrinica, è plausibile che i recettori P2 giochino un ruolo di primaria importanza nel regolare il *cross-talk* tra queste popolazioni cellulari a livello del microambiente vascolare. Se questo è vero, una deregolazione o iperattivazione dei segnali attivati da nucleotidi extracellulari potrebbe essere alla base dello sviluppo di stati infiammatori cronici e di fenomeni aterosclerotici a livello vascolare, facendo dei recettori P2 un nuovo target farmacologico per la cura di queste malattie.

Nell'insieme, tutti questi esempi contribuiscono a dimostrare l'importante ruolo svolto dai nucleotidi extracellulari nel regolare la motilità e la chemiotassi di cellule del sistema emopoietico e non. In particolare, i dati raccolti fino a questo momento sembrano suggerire che queste molecole possano agire come mediatori non peptidici di situazioni di pericolo, nonché come meccanismo di segnalazione di danni tissutali acuti e cronici.

Nonostante l'espandersi della letteratura scientifica in questo campo, non esiste tuttavia al momento alcun dato relativo al ruolo modulatore svolto dai nucleotidi extracellulari sul compartimento staminale emopoietico. Partendo da quanto dimostrato recentemente nel nostro laboratorio (relativamente alla capacità dei nucleotidi extracellulari di potenziare l'espansione di cellule staminali CD34<sup>+</sup>), ci siamo quindi chiesti se queste molecole avessero

un effetto anche su un'altra proprietà fondamentale di questa popolazione cellulare, vale a dire il comportamento migratorio.

I dati raccolti nel corso di questo studio contribuiscono a dimostrare che la modulazione di fenomeni chemiotattici da parte di recettori P2 non è limitata a cellule emopoietiche mature (quali monociti, neutrofilo e cellule dendritiche), ma si estende anche al compartimento dei progenitori più immaturi. Queste osservazioni aprono la strada ad interessanti re-interpretazioni sul ruolo delle cellule staminali emopoietiche in situazioni di stress e di danni tissutale, di cui, come visto, i nucleotidi extracellulari sembrano essere espressione universale.

---

## MATERIALI E METODI

---

### **1. Raccolta di cellule staminali emopoietiche.**

I progenitori emopoietici oggetto di questo studio sono stati ottenuti dal sangue periferico di 35 donatori adulti (in seguito a rilascio di consenso informato scritto), sottoposti a mobilizzazione con il fattore di crescita G-CSF.

In condizioni fisiologiche basali, la percentuale di cellule staminali liberamente circolanti nel sangue periferico di un individuo adulto è estremamente bassa (<0,01%). Tale percentuale può essere tuttavia incrementata in modo significativo mediante trattamenti di mobilizzazione dei progenitori emopoietici dal midollo osseo al circolo ematico, fenomeno che è possibile indurre attraverso il trattamento con il fattore di crescita granulocitario (G-CSF).

I donatori sono stati trattati con G-CSF umano ricombinante glicosilato (r-hu-G-CSF), somministrato per via sottocutanea, alla concentrazione di 10 µg/kg/die per un intervallo di 5-6 giorni. Al termine di questo periodo si raggiunge il picco di mobilitazione dei progenitori emopoietici nel sangue periferico e i donatori vengono sottoposti a prelievo leucoferetico.

Il campione di leucoferesi utilizzato per scopi sperimentali (circa 1-2 mL) viene diluito con soluzione fisiologica, stratificato su Ficoll-Hypaque (densità: 1.077 g/mL) e centrifugato alla velocità di 2000 rpm per venti minuti. Questa procedura consente la separazione su gradiente di densità di due frazioni cellulari: eritrociti e granulociti polimorfonucleati, che attraversano il gradiente e precipitano sul fondo della provetta, e cellule mononucleate (MNC) e piastrine, le quali si raccolgono a livello dell'interfaccia tra Ficoll e siero. Le cellule MNC così ottenute, dopo accurati lavaggi in soluzione fisiologica, vengono contate mediante un emocitometro (camera di Neubauer) e la percentuale di vitalità viene calcolata mediante il test di esclusione del colorante Trypan Blue (che permea esclusivamente attraverso la membrana di cellule morte).

## **2. Arricchimento della frazione staminale mediante separazione immunomagnetica di cellule CD34<sup>+</sup>.**

La frazione di cellule MNC è stata ulteriormente arricchita nella componente CD34<sup>+</sup>, mediante il sistema di selezione basato su colonne immunomagnetiche (Miltenyi Biotec; Bergish Gladbach, Germany), che permette l'ottenimento di buoni recuperi (>85%) ed una notevole purezza della popolazione separata (94 ± 5%). Questo sistema di separazione è basato sulla selezione positiva della componente che, nell'ambito dell'eterogenea popolazione di cellule mononucleate, esprime il marker di staminalità CD34. La colonna di separazione, contenente la matrice attraverso la quale viene fatta passare la soluzione cellulare, viene posta all'interno di un magnete: il campo magnetico permette così di bloccare all'interno della matrice le cellule marcate con le biglie magnetiche, associate all'anticorpo monoclonale anti-CD34, lasciando invece eluire liberamente la frazione CD34-negativa. Al termine della separazione, il recupero della popolazione CD34<sup>+</sup> avviene allontanando la colonna dal campo

magnetico ed applicando, mediante un apposito stantuffo, una pressione sufficiente a consentire il distacco delle cellule dalla matrice. Le cellule così recuperate vengono ulteriormente purificate attraverso un secondo, analogo passaggio attraverso la colonna di separazione, consentendo così di ottenere un eccellente livello di purezza della frazione CD34<sup>+</sup>.

Un ulteriore vantaggio del sistema di separazione Miltenyi, rispetto ad altri analoghi sistemi di selezione, consiste nell'utilizzo di microbiglie del diametro di soli 50 nm e di composizione tale (ossido di ferro e polisaccaridi), da permetterne la rapida "biodegradazione", evitando così qualsiasi interferenza con le funzioni cellulari o la vitalità della popolazione separata.

### **3. Analisi degli ioni Calcio intracitoplasmatici.**

Gli ioni calcio, oltre a partecipare all'equilibrio osmotico della cellula, rappresentano un'importante classe di secondi messaggeri, molecole che permettono la traduzione citoplasmatica di segnali generati da recettori di membrana. In condizioni basali, le concentrazioni del calcio citoplasmatico si mantengono molto basse, ma tendono ad aumentare significativamente in seguito a stimolazione.

Anche i recettori della famiglia P2Y per i nucleotidi extracellulari utilizzano come secondo messaggero il calcio citosolico, le cui variazioni possono essere studiate marcando le cellule con specifici traccianti. In questo studio la concentrazione degli ioni calcio è stata studiata grazie al colorante FURA-2/AM, un derivato benzofuranico che agisce come chelante ad alta affinità degli ioni calcio; la formazione del complesso (in rapporto stechiometrico 1:1) induce una modifica nella struttura del colorante, associata all'emissione di fluorescenza, il cui incremento è direttamente proporzionale alla concentrazione intracitoplasmatica di calcio nella cellula.

Le cellule sono state risospese, alla concentrazione di 10<sup>7</sup>/mL in soluzione salina (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM NaHPO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucosio, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> e 20 mM HEPES a Ph 7.4 con NaOH) ed incubate con FURA-2/AM (4 μM; Sigma



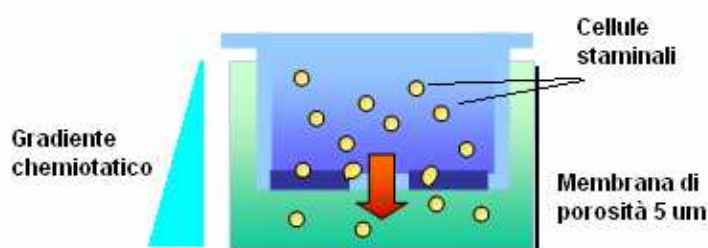
Aldrich) e Sulfinilpirazone (250  $\mu\text{M}$ ; Sigma Aldrich). Quest'ultimo causa il blocco dei pori cellulari, consentendo la compartimentazione del calcio citosolico all'interno della cellula. Al termine dell'incubazione (15 minuti a 37°C), le cellule sono state analizzate al fluorimetro (LS50 Perkin Elmer, Beaconsfield, UK) al rapporto di eccitazione 340/380 e con una lunghezza d'onda di eccitazione di 509 nm.

#### 4. Saggi di migrazione.

I saggi di migrazione *in vitro* utilizzati in questo studio si ispirano al modello delle *Boyden chambers*. Questo sistema, introdotto originariamente da Boyden per lo studio della chemiotassi leucocitaria, si basa sull'utilizzo di una camera di coltura, separata in due compartimenti distinti, ma comunicanti tra di loro attraverso una membrana semipermeabile. Questo sistema ha inoltre il pregio, rispetto ad altri saggi di migrazione, di consentire lo studio sia di molecole chemiotattiche (che stimolano la migrazione direzionale delle cellule), che di sostanze ad azione semplicemente chemiocinetica (vale a dire, che agiscono come promotori aspecifici e adirezionali della motilità cellulare).

Il sistema utilizzato in questo studio per lo studio della chemiotassi di cellule staminali è basato, in particolare, sull'utilizzo di pozzetti *transwell*. Come mostrato nello schema (Figura 7), il sistema è costituito da due pozzetti: quello superiore, in cui vengono seminate le cellule di cui si vuole studiare il comportamento migratorio, e il pozzetto inferiore, contenente una o più chemiotassine. I due pozzetti sono separati tra di loro da una membrana di porosità variabile, a seconda delle dimensioni delle cellule in esame. In questo studio, la migrazione chemotattica di cellule CD34<sup>+</sup> è stata studiata utilizzando il piastre *transwell* del diametro di 6.5

nm, con una membrana di porosità 5  $\mu\text{m}$  (Costar, Cambridge, MA).



**Figura 7.** Schema rappresentativo del sistema *transwell* per lo studio della migrazione *in vitro* di cellule staminali emopoietiche (72-74).

Le cellule CD34<sup>+</sup> ( $1-2 \times 10^5$ ), risospese in 100  $\mu$ L di terreno privo di siero (X-VIVO 15, Cambrex Bioscience, Verviers. Belgium), sono state introdotte nel pozzetto superiore, mentre nella camera inferiore sono stati aggiunti 600  $\mu$ L di terreno X-VIVO, con o senza CXCL12 (150 ng/mL). I nucleotidi UTP (10  $\mu$ M), ATP (1 nM) o gli analoghi dinucleotidici INS415 (10  $\mu$ M) e INS45937 (100 nM) sono stati aggiunti al pozzetto inferiore o superiore, al fine di valutare, rispettivamente, il potenziale chemotattico di queste sostanze o la loro capacità di stimolare le cellule staminali a rispondere a gradienti chemotattici di CXCL12.

Le concentrazioni utilizzate di nucleotidi o di analoghi dinucleotidici sono state dedotte da preliminari esperimenti di dose-risposta (non mostrati).

Al termine di un'incubazione di 4 ore a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, le cellule migranti (camera inferiore) e le cellule non-migranti (camera superiore) sono state raccolte e la percentuale di migrazione è stata calcolata nel seguente modo:  $(\text{cellule migranti} - \text{cellule migranti spontaneamente}) \times 100 / 1-2 \times 10^5$  cellule. La percentuale di cellule migranti spontaneamente dal pozzetto superiore all'inferiore, in assenza di un gradiente di CXCL12 o di nucleotidi, è stata sempre inferiore all'1% delle cellule seminate inizialmente.

Esperimenti di migrazione sono stati eseguiti anche con cellule CD34<sup>+</sup> precedentemente incubate (per un'ora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in presenza o assenza di nucleotidi, per analizzare un'eventuale azione di *priming* esercitata da UTP e ATP. Al termine dell'incubazione, e prima dell'allestimento del saggio di migrazione, le cellule sono state lavate e risospese in terreno X-VIVO 15 in assenza di nucleotidi.

## 5. Saggi di inibizione e trattamento con tossine.

Al fine di indagare in maggior dettaglio le vie di traduzione del segnale reclutate dalla stimolazione dei recettori P2Y mediante UTP, cellule CD34<sup>+</sup> di origine umana sono state trattate con diverse tossine, note per la loro capacità di bloccare specifici componenti di cascate trasduzionali del segnale.

- Tossina B di *Clostridium Difficile* (Tox B, Sigma-Aldrich), nota per la sua capacità di inibire le proteine della famiglia delle RhoGTPasi, coinvolte a loro volta nella traduzione di stimoli di motilità cellulare. La popolazione di cellule CD34<sup>+</sup> è stata incubata in terreno IMDM + 10% FBS (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) per 18 ore, in presenza della Tossina B (100 ng/mL) e successivamente saggiata in esperimenti di migrazione, come descritto precedentemente.
- Tossina della pertosse (PTX, derivata da *Bordetella Pertussis*, Sigma-Aldrich), nota per la sua capacità inibitoria ad ampio spettro sulle subunità  $\alpha$  di proteine G, associate a recettori a sette eliche transmembrana. Cellule CD34<sup>+</sup> sono state incubate in terreno IMDM + 10% FBS (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) per 90 minuti in presenza di PTX (1  $\mu$ g/mL) prima del saggio di migrazione.
- Y27632, inibitore di ROCK (Rho kinase, Calbiochem, Nottingham, UK): inibisce la cascata trasduzionale a valle delle Rho GTPasi, andando ad inattivare la funzione della chinasi ROCK. L'inibitore Y27632 (10  $\mu$ M) è stato incluso direttamente nel pozzetto superiore dei transwell, per tutta la durata del saggio di migrazione.

Parallelamente, al fine di indagare il ruolo del recettore CXCR4 nella migrazione promossa dai nucleotidi extracellulari, è stata testata l'attività dell'anticorpo anti-CXCR4 umano (clone 12G5, R&D systems, Wiesbaden, Germany). Cellule umane CD34<sup>+</sup> sono state pre-incubate, in presenza dell'anticorpo anti-CXCR4 (50  $\mu$ g/mL) o del controllo isotipico IgG, per 30 minuti a temperatura ambiente, prima del saggio di chemotassi.

## 6. Saggi clonogenici.

Gli studi di clonogenicità hanno lo scopo quantificare la frequenza di progenitori emopoietici commissionati (CFU-C), presenti nella frazione CD34<sup>+</sup> di cellule migrate, recuperate del pozzetto inferiore.

Le cellule migrate nel pozzetto inferiore del sistema *transwell* sono state seminate in un terreno semisolido avente la seguente composizione: 1% metilcellulosa in terreno IMDM, 30% FBS, 1% BSA,  $10^{-4}$ M  $\beta$ - mercaptoetanolo, 2 mM L-glutamina, 3 U7mL rhEPO, 50 ng/mL rhSCF, 10 ng/mL rh GM-CSF e 10 ng/mL rhIL-3 (MethoCult H4434, Stem Cell Technologies; Vancouver, BC, Canada). Dopo 14 giorni di incubazione a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, le piastre di coltura sono state analizzate al microscopio invertito e si è proceduto alla quantificazione di colonie granulocito-magrofagiche (GM-CFU), eritroidi (BFU-E) e miste (CFU-Mix), complessivamente definite come CFU-C. Sono state considerate come colonie aggregati di almeno 50 cellule.

## 7. Analisi citofluorimetriche.

Le cellule CD34<sup>+</sup>, migrate e non migrate, recuperate dal saggio di migrazione, sono state incubate per 20 minuti al buio a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi monoclonali, coniugati con isotiocianato di fulorescina (FITC) o con ficoeritrina (PE): CXCR4-PE (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), CD49d-FITC e CD49e-PE (Necton-Dickinson, Heidelberg, Germany).

La marcatura intracellulare dell'antigene di CXCR4 è stata eseguita dopo aver bloccato i recettori di superficie mediante un'incubazione di un'ora a 4°C con anticorpo anti-CXCR4 umano non coniugato (10  $\mu$ g/mL). Al termine dell'incubazione, le cellule sono state lavate per eliminare l'eccesso di anticorpo, fissate e permeabilizzate con FIX & PERM Reagents (CALTAG Laboratories, Burlingame, CA, USA); si è quindi proceduto con la marcatura intracellulare con anticorpo anti-CXCR4 umano coniugato con PE.

L'analisi della percentuale di polimerizzazione dell'actina è stata condotta come descritto precedentemente (75), utilizzando la tossina Phalloidina, che ha la proprietà di legare i filamenti di actina impedendone la de-polimerizzazione, coniugata con FITC.

L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita mediante il citofluorimetro FACS Calibur e utilizzando il programma di analisi CellQuest (Becton-Dickinson). L'intensità media di fluorescenza dei campioni analizzati è stata calcolata dall'istogramma di fluorescenza.

## 8. Saggi di adesione.

L'allestimento dei saggi di adesione prevede l'adsorbimento di Fibronectina (FN; Sigma-Aldrich), alla concentrazione di 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  in PBS, ai pozzetti di coltura (incubazione *overnight* a 4°C). I pozzetti di controllo sono stati invece adsorbiti con albumina di siero bovino 1% (BSA; Sigma Chemical). Al termine dell'incubazione, al fine di bloccare i siti di legame aspecifici, la soluzione di FN è stata rimossa mediante aspirazione e i pozzetti sono stati incubati per ulteriori 30 minuti con RPMI 1640 (Cambrex Bio Science) e 1% della frazione V di BSA (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Dopo due lavaggi in RPMI 1640 contenente 25 mM HEPES (BioWhittaker Europe), 1-2 x 10<sup>5</sup> cellule CD34<sup>+</sup> sono state risospese in RPMI 1640, 0.1% BSA, e incubate in presenza di UTP, ATP, CXCL12 o terreno di controllo. Al termine di un'incubazione di un'ora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> le cellule non aderenti al pozzetto sono state raccolte, mediante due lavaggi con PBS a temperatura ambiente (76). Le cellule aderenti sono state invece recuperate dopo trattamento con soluzione Accutase (Innovative Cell Technologies, La Jolla, CA) per 10 minuti a 37°C. Le cellule aderenti e non-aderenti così recuperate sono state contate e la percentuale di adesione è stata calcolata nel modo seguente:  $(\text{numero di cellule aderenti})/(\text{numero di cellule aderenti} + \text{cellule non aderenti}) \times 100$ . La percentuale di adesione ai pozzetti di controllo trattati con BSA è sempre risultata inferiore all'1%.

## 9. Saggio di homing competitivo in topi NOD/SCID.

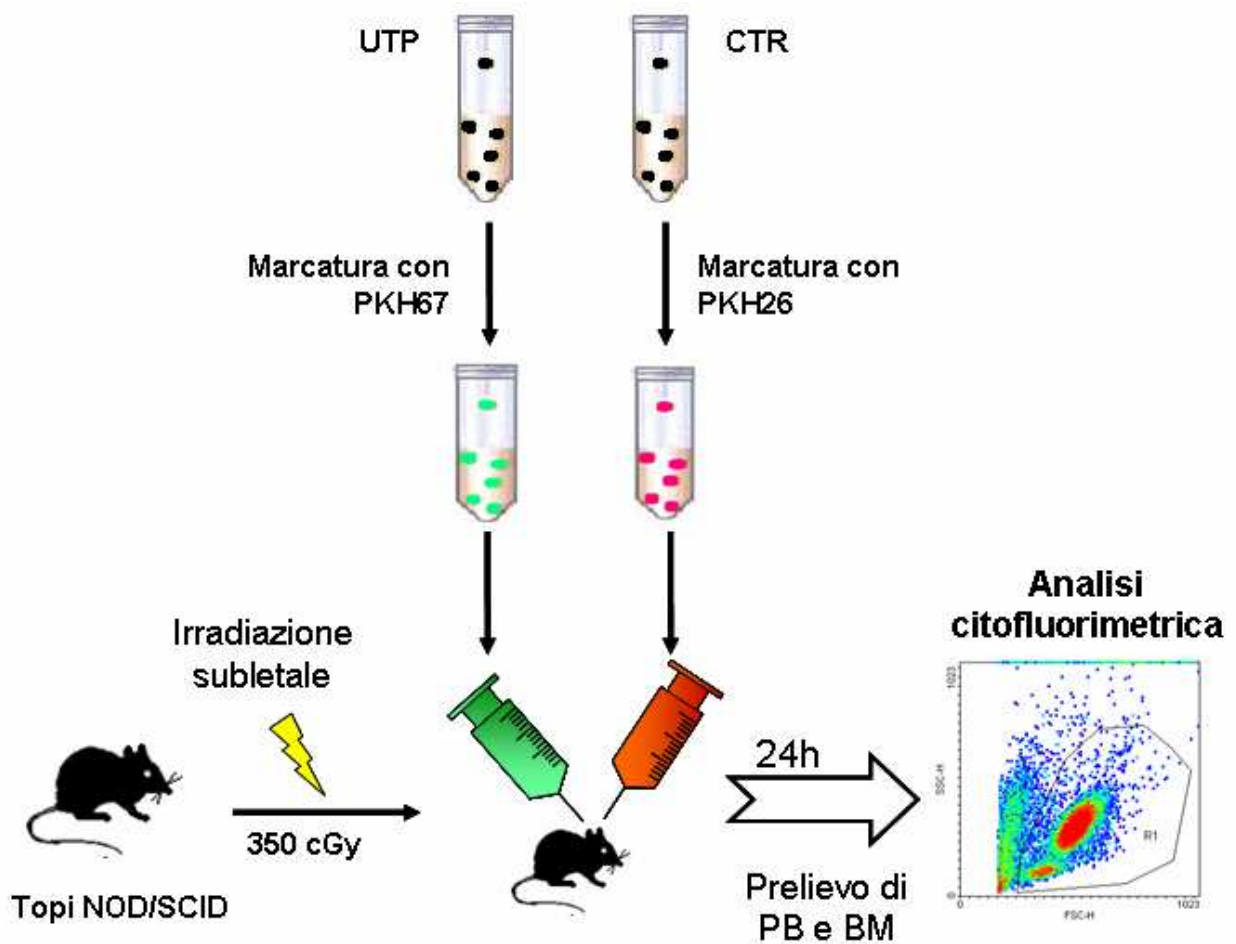
Per valutare la capacità del nucleotide extracellulare UTP di influenzare l'*homing* di cellule staminali emopoietiche, cellule CD34<sup>+</sup> di origine umana sono state trapiantate in topi NOD/SCID. Cellule CD34<sup>+</sup> umane sono state suddivise in due aliquote e marcate con una sonda fluorescente rossa (PKH26, Sigma) o verde (PKH67, Sigma). Le cellule marcate con PKH67 sono poi state incubate (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), in terreno privo di siero, in presenza di UTP (10  $\mu\text{M}$ ) per 1, 6 o 24 ore; al contrario, la popolazione marcata con PKH26 è stata incubata

nelle stesse condizioni e per gli stessi intervalli di tempo, ma in presenza del solo terreno di coltura.

Topi NOD/SCID (n=6 per gruppo di studio), precedentemente irradiati con una dose subletale di radiazioni (350 cGy), sono stati co-reinfusi con cellule provenienti da entrambe le popolazioni cellulari ( $10^6$  cellule/topo), vale a dire cellule marcate in rosso e in verde. Come procedura interna di controllo, altri topi NOD/SCID sono stati reinfusi con cellule trattate con UTP e marcate in rosso (PKH26) o con cellule non trattate, marcate in verde (PKH67).

Venti-quattro ore dopo il trapianto, i topi riceventi sono stati sacrificati e si è proceduto all'analisi, per via citofluorimetrica, della percentuale di cellule umane ( $CD34^+$  e  $CD45^+$ ) presenti nel sangue periferico e nel midollo osseo. Dopo trattamento di lisi dei globuli rossi, i campioni sono stati acquisiti ed analizzati mediante FACS Calibur (Becton and Dickinson), escludendo dall'analisi cellule morte, frammenti cellulari e piastrine. Dopo acquisizione di almeno 100,000 cellule/campione, le analisi sono state ritenute informative quando un adeguato numero di eventi (pari a 100-200 cellule) sono stati raccolti nella regione relativa alla popolazione di cellule di origine umana (Figura 8).

La percentuale di cellule marcate è stata valutata e confrontata con appropriati controlli negativi. L'espressione dell'antigene umano  $CD45$  nel sangue periferico e nel midollo dei topi trapiantati è stata ulteriormente confermata mediante RT-PCR e Southern Blotting. Per lo studio comparativo della percentuale di *homing* nel sangue periferico e nel midollo osseo, la popolazione di cellule  $CD34^+CD45^+$  è stata ulteriormente analizzata per la percentuale relativa di cellule  $PKH26^+$  e  $PKH67^+$  (vale a dire, cellule trattate con UTP o con terreno privo di siero).



**Figura 8.** Schema rappresentativo dell'esperimento di *homing* competitivo nel modello murino.

## 10. Microarrays.

Cellule CD34<sup>+</sup> di origine umana, purificate con il sistema immunomagnetico Miltenyi, sono state piastrate alla concentrazione di 10<sup>6</sup>/mL in terreno privo di siero (X-VIVO 15) per 24 ore, in presenza/assenza di UTP (10 μM), CXCL12 (150 ng/mL) o con entrambi i fattori contemporaneamente.

Esperimenti preliminari hanno mostrato, dopo solo un'ora di trattamento, un incremento dei messaggeri di numerosi geni coinvolti nel controllo della motilità cellulare. Tuttavia, la

modulazione più significativa del contenuto cellulare di mRNA si è osservata dopo 24 ore (dati non mostrati).

Il contenuto cellulare di mRNA è stato isolato utilizzando il *kit* RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen, Valencia, CA), secondo le istruzioni del produttore, mentre RNA chips (Agilent RNA 6000 Nano LabChip kit, Agilent Technologies, Waldbrunn, Germany) sono stati utilizzati per valutare la concentrazione, purezza e integrità dei campioni di RNA, utilizzando l'analizzatore Agilent 2100. Il contenuto in mRNA di 6 diversi donatori è stato raggruppato al fine di ottenere una quantità minima di almeno 2µg di mRNA/campione, sia per il gruppo di cellule trattate, sia per il gruppo di controllo.

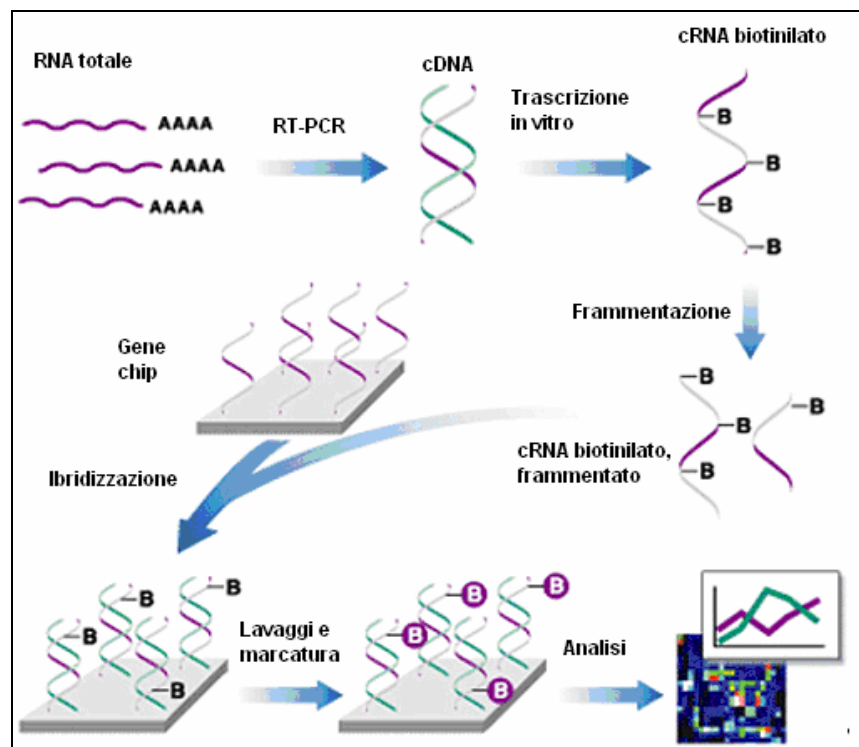
Utilizzando il protocollo standard Affimetrix (Affimetrix, Santa Clara, CA) (Figura 9), sono state condotte le reazioni di sintesi dei target coniugati con biotina, così come l'ibridazione su Affimetrix HG-U133A GeneChip, la marcatura e l'analisi delle sonde, a partire da 2µg di RNA totale (77).

Per determinare il quantitativo di mRNA trascritto è stato utilizzato l'algoritmo di analisi assoluta GeneChip Operative Software (GCOS), mentre l'algoritmo di analisi comparativa GCOS è stato sfruttato per confrontare i diversi livelli di espressione genica tra campioni diversi. Da tale analisi sono emersi i geni differenzialmente espressi nelle diverse condizioni sperimentali (cellule non trattate, trattate con UTP, con CXCL12 o con UTP+CXCL12): tali geni sono stati identificati come "I" (*increased*, aumentati) o "D" (*decreased*, diminuiti) a seconda del tipo di modulazione del livello di espressione emersa. Dall'analisi sono stati invece esclusi i geni identificati come privi di variazioni significative nel quantitativo di mRNA. Tale lista di geni e, indipendentemente, l'analisi generata dall'algoritmo GCOS di analisi assoluta sono stati analizzati mediante il software GeneSpring™, versione 7.2 (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA). Per la normalizzazione dei dati, ogni valore è stato diviso per il cinquantesimo percentile di tutti i segnali rilevati in quel campione. Il percentile è stato calcolato utilizzando tutti i segnali superiori a 10. Il valore relativo ad ogni gene è stato diviso per la mediana dei suoi valori in ogni campione analizzato.

I geni che presentano un'intensità normalizzata compresa tra 0.5 e 2 in tutte le condizioni sperimentali sono stati esclusi.



Il programma DAVID TOOL 2.1 Beta (<http://apps1.niaid.nih.gov/david>) è stato utilizzato per analizzare la lista di geni ed identificare la prevalenza di specifiche classi funzionali, in accordo con la classificazione Gene-Ontology.



**Figura 9.** Schema rappresentativo delle diverse fasi relative all'analisi di *microarray*.

## 11. Analisi statistica dei dati.

I risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard di almeno tre esperimenti distinti.

I saggi colturali *in vitro* sono stati analizzati con il test di Wilcoxon (Wilcoxon rank sum). Per gli esperimenti *in vivo* di trapianto, le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il test t di Student e l'analisi di varianza (ANOVA) quando i dati erano normalmente distribuiti; per dati non normalmente distribuiti, è stata utilizzata l'analisi non parametrica di Spearman e

Mann-Whitney. Tutti i valori di  $p$  inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

---

## RISULTATI

---

### **1. Saggi di migrazione *in vitro*: il trattamento con UTP incrementa la risposta chemiotattica di cellule staminali emopoietiche umane verso gradienti di CXCL12.**

I saggi di migrazione *in vitro*, come ampiamente sottolineato dalla letteratura, rappresentano un modello attendibile per lo studio del comportamento migratorio di cellule staminali emopoietiche e di come queste rispondano a stimoli chemiotattici.

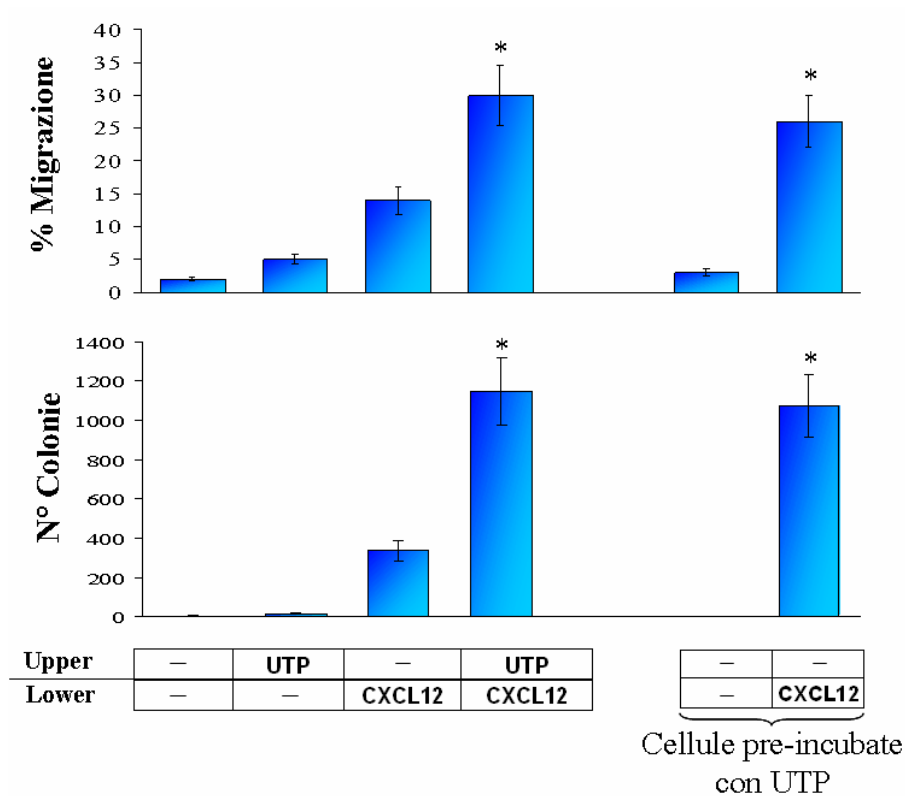
Nel presente studio è stata analizzata la capacità dei nucleotidi extracellulari ATP ed UTP di influenzare la risposta migratoria di cellule staminali emopoietiche umane CD34<sup>+</sup>, sia utilizzati da soli, che in combinazione con la chemochina CXCL12, al momento nota come il più potente fattore chemiotattico per progenitori emopoietici.

La stimolazione con il solo nucleotide UTP (condizione UTP/ - ) aggiunto, in assenza di altri fattori, alla sospensione cellulare presente nella camera superiore del *transwell*, non ha prodotto alcun incremento statisticamente significativo della percentuale di cellule CD34<sup>+</sup> migranti verso il pozzetto inferiore. Tuttavia, quando nel pozzetto inferiore è stata aggiunta la chemochina CXCL12 (condizione UTP/CXCL12), la stimolazione con UTP ha indotto un incremento significativo della quota di cellule migranti, rispetto alle cellule non stimolate con UTP (condizione - /CXCL12) (Figura 10).

Per verificare se questo tipo di stimolazione dipendesse dalla presenza di UTP nel pozzetto, l'esperimento è stato ripetuto pre-incubando cellule CD34<sup>+</sup> con UTP 10 $\mu$ M per un intervallo di un'ora, al termine della quale il terreno di incubazione è stato lavato via e le cellule sono state risospese in terreno privo di nucleotidi. Le cellule sono state poi saggiate in esperimenti di migrazione analoghi a quelli descritti sopra, ottenendo risposte sovrapponibili (Figura 10 – pannello superiore, cellule pre-stimate con UTP,  $p < 0.05$ ). Questo dato indica che i nucleotidi extracellulari esercitano già nell'arco di un'ora un'azione di stimolazione su cellule CD34<sup>+</sup> tale da renderle maggiormente responsive all'azione chemiotattica di CXCL12.

<i>Simbolo</i>	<i>Pozzetto superiore</i>	<i>Pozzetto inferiore</i>
-/-	Cellule CD34 <sup>+</sup>	Nessuna chemiotassina
<b>UTP/-</b> <b>ATP/-</b>	Cellule CD34 <sup>+</sup> in presenza di UTP (o ATP)	Nessuna chemiotassina
<b>-/CXCL12</b>	Cellule CD34 <sup>+</sup>	CXCL12
<b>UTP/CXCL12</b> <b>ATP/CXCL12</b>	Cellule CD34 <sup>+</sup> in presenza di UTP (o ATP)	CXCL12
<b>-/UTP</b>	Cellule CD34 <sup>+</sup>	UTP
<b>-/UTP + CXCL12</b>	Cellule CD34 <sup>+</sup>	UTP + CXCL12

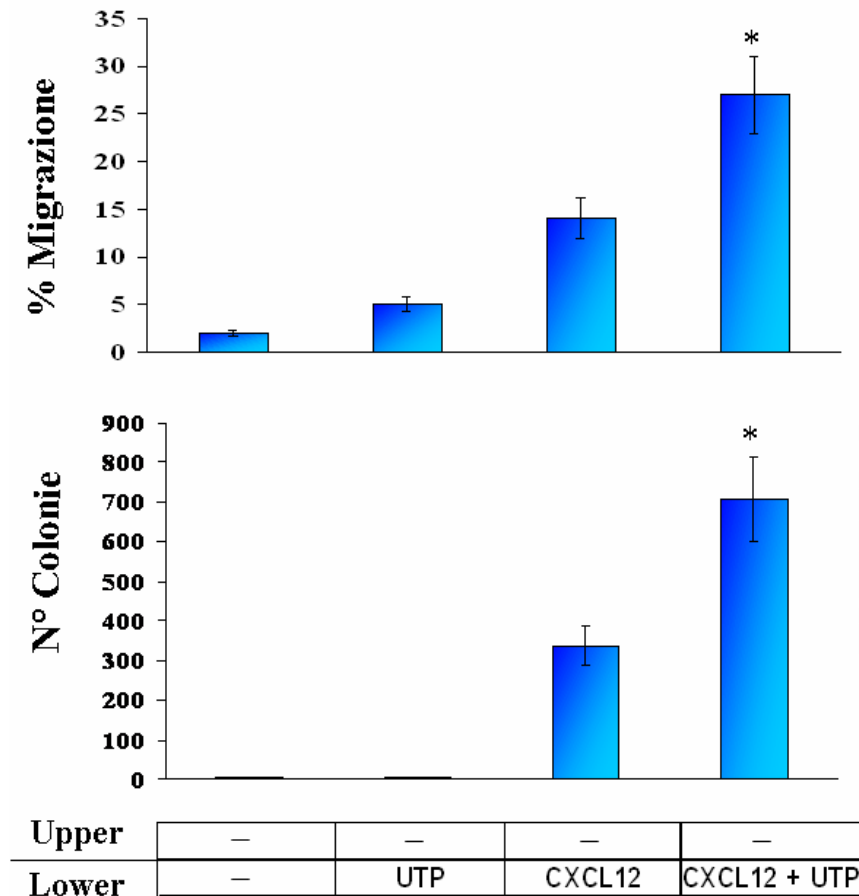
Saggi di migrazione *in vitro*: legenda alle figure e al testo



**Figura 10. Saggio di migrazione *in vitro* di cellule CD34<sup>+</sup> in risposta al nucleotide extracellulare UTP.**

L'UTP, quando utilizzato da solo, influenza solo leggermente il pattern di migrazione spontanea di cellule CD34<sup>+</sup>, ma aumenta in modo significativo la risposta chemiotattica al CXCL12 ( $p < 0,05$ ). Gli esperimenti con cellule CD34<sup>+</sup> pre-incubate con UTP per un'ora mostrano analoghe risposte migratorie (pannello A). Questi risultati sono stati confermati anche da saggi clonogenici allestiti con le cellule migrate (pannello B).

Successivamente è stata studiata la capacità dei nucleotidi extracellulari di esercitare un effetto chemiotattico di per sé, analogo a quello descritto per CXCL12. Aggiungendo UTP da solo al pozzetto inferiore dei *transwells*, non è stato però riscontrato alcun aumento della capacità migratoria di cellule CD34<sup>+</sup>. Tuttavia, quando l'UTP è stato combinato con CXCL12 nel pozzetto inferiore, ciò ha prodotto un incremento sinergico della percentuale di cellule migranti ( $p < 0,05$ , Figura 11).

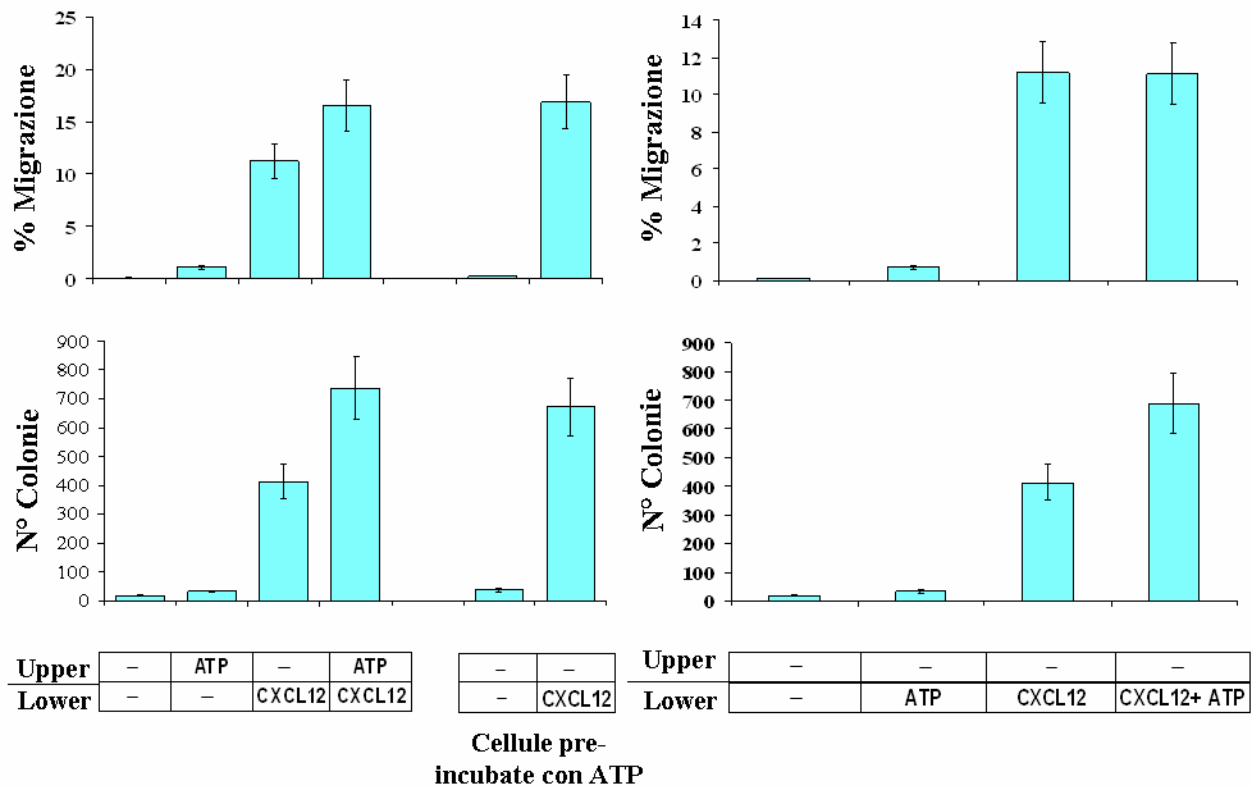


**Figura 11. Attività chemiotattica del nucleotide UTP.** Il nucleotide extracellulare UTP mostra, quando utilizzato da solo, una modesta attività chemiotattica. Tuttavia, la combinazione di UTP e CXCL12 nel pozzetto inferiore aumenta significativamente la risposta migratoria di cellule CD34<sup>+</sup>, rispetto alla chemiotattica indotta dal solo CXCL12 (pannello A). Questi risultati sono stati confermati anche da saggi clonogenici allestiti con le cellule migrate (pannello B).

Come ulteriore conferma della consistenza di questi risultati, le cellule migrate nel pozzetto inferiore nei saggi *transwell* sono state successivamente testate per il loro potenziale clonogenico in colture a breve termine in metilcellulosa. Come mostrato dalle figure 10 e 11, il numero di colonie CFU-C è consistente con il conteggio delle cellule migranti attraverso il *transwell* (incremento di 3,4 volte del numero di CFU-C nei campioni trattati con UTP rispetto

al controllo non trattato). Inoltre, le colture in metilcellulosa dimostrano che le cellule migranti in seguito a stimolazione con UTP, preservano la capacità di dare origine a colonie in colture semisolide, caratteristica tipica dei progenitori emopoietici.

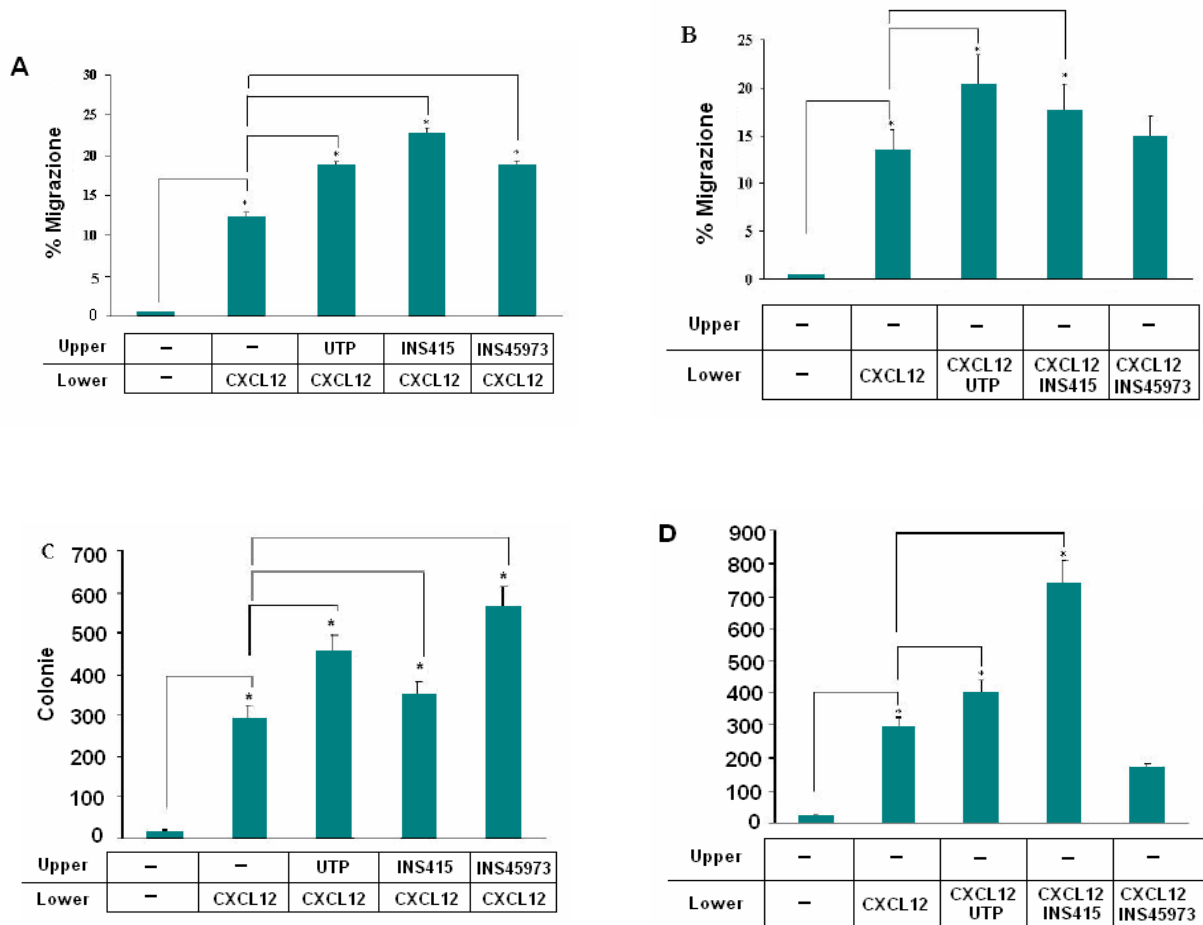
Gli stessi esperimenti di migrazione e saggi clonogenici sono stati condotti in presenza del nucleotide ATP, senza tuttavia ottenere una modulazione statisticamente significativa della capacità migratoria delle cellule CD34<sup>+</sup> (con  $p=0.06$  nei saggi di migrazione e  $p=0.04$  nei saggi clonogenici) come mostrato nella Figura 12. Per questo motivo l'UTP è stato scelto come nucleotide d'elezione per gli ulteriori saggi sperimentali descritti in questo studio.



**Figura 12. Saggio di migrazione *in vitro* di cellule CD34<sup>+</sup> in risposta al nucleotide extracellulare ATP.**

La presenza del nucleotide ATP nei saggi di migrazione non ha indotto alcuna sensibile modifica del pattern di migrazione di cellule CD34<sup>+</sup>. Questi risultati sono stati confermati anche da saggi clonogenici allestiti con le cellule migrate (pannelli inferiori).

Ulteriori analisi sono state condotte in presenza di INS415 ed INS45973, analoghi dinucleotidici di ATP ed UTP resistenti alla conversione enzimatica in sub-metaboliti, il cui utilizzo ha prodotto risultati analoghi a quelli già ottenuti con i corrispondenti nucleotidi trifosfati (Figura 13).



**Figura 13. Saggi di migrazione e di clonogenicità in presenza degli analoghi dinucleotidici INS415 ed INS45973.** (A) Saggi di migrazione in risposta al gradiente di CXCL12; (B) test di attività chemiotattica; (C, D) saggi clonogenici allestiti con le cellule migrate negli esperimenti mostrati in A e B.



Queste prime osservazioni ci hanno permesso di formulare le seguenti ipotesi:

- i. i nucleotidi extracellulari, in particolare l'UTP, sono in grado di incrementare la migrazione di cellule staminali CD34<sup>+</sup>, aumentandone la responsività a CXCL12 e promuovendone in modo sinergico l'azione chemiotattica del CXCL12 stesso.
- ii. l'attività biologica osservata (come dimostrano gli esperimenti con analoghi stabili di ATP ed UTP) è imputabile alla forma trifosfata dei nucleotidi e non a loro metabolici secondari, prodotti di degradazioni enzimatiche.
- iii. il recettore responsabile dell'attività biologica dell'UTP su cellule CD34<sup>+</sup> è molto probabilmente il recettore P2Y<sub>2</sub>, dal momento che (come mostrato dal nostro gruppo in precedenza) gli altri due recettori attivabili dall'UTP (vale a dire P2Y<sub>4</sub> e P2Y<sub>6</sub>) non sono espressi da cellule CD34<sup>+</sup> umane.

## **2. Ruolo del recettore CXCR4 nella risposta migratoria attivata dal nucleotide UTP.**

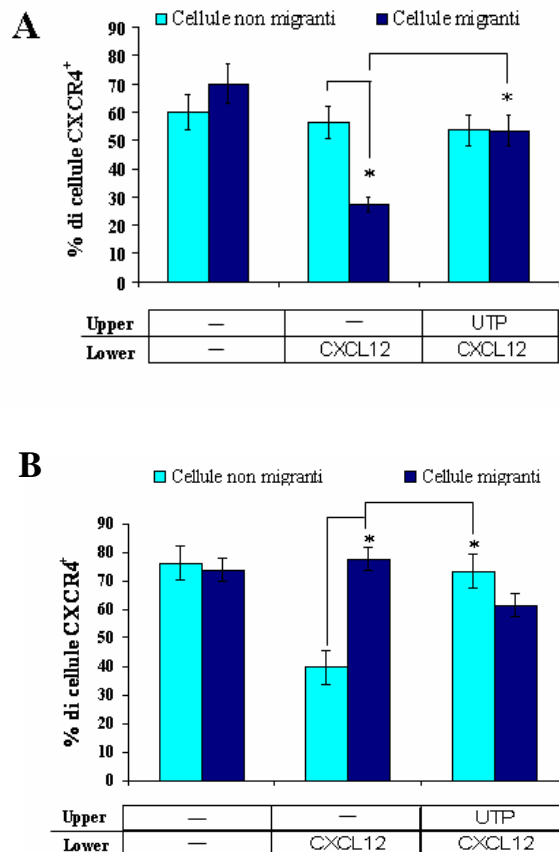
Alla luce del ruolo chiave svolto dall'interazione tra CXCL12 ed il suo recettore CXCR4 nel modulare la migrazione di progenitori emopoietici, è spontaneo chiedersi se l'effetto stimolante dell'UTP possa essere imputabile ad un incremento del livello di espressione di CXCR4 da parte delle cellule CD34<sup>+</sup>.

A questo scopo, cellule CD34<sup>+</sup> sono state incubate in presenza o assenza di UTP (10µM) per diversi intervalli di tempo (un'ora, sei ore e ventiquattr'ore). L'analisi citofluorimetrica di CXCR4 non ha tuttavia mostrato alcuna differenza significativa nei livelli di CXCR4 nelle cellule trattate con UTP, rispetto ai controlli non trattati (dati non mostrati).

Lo stesso tipo di analisi è stata tuttavia condotta, in seguito a saggi di migrazione, comparando i livelli di espressione di CXCR4 in cellule migranti e in cellule non migranti, facendo emergere differenze più significative. Infatti, le cellule migranti verso un gradiente di CXCL12 esprimono livelli significativamente inferiori di CXCR4 se confrontate con la controparte non migrante (Figura 14A).

Il livello di *down-regulation* del recettore CXCR4 è inoltre consistente con il tasso di internalizzazione della molecola in seguito a stimolazione con CXCL12 (Figura 14B). Al

contrario, quando il nucleotide UTP viene aggiunto al pozzetto superiore l'effetto di *down-regulation* su cellule migranti viene bloccato (Figura 14A); a questa osservazione si associa una diminuita espressione intracitoplasmatica di CXCR4 (Figura 14B).



**Figura 14. Livelli di espressione in membrana (A) ed intracitoplasmatici (B) del recettore CXCR4 in cellule migranti e non migranti, in seguito a stimolazione con UTP e CXCL12.** Le percentuali di espressione di cellule CXCR4<sup>+</sup> sono state calcolate nelle popolazioni di cellule migranti e non-migranti. **(A)** La popolazione di cellule migranti verso CXCL12 presenta una *down-regulation* dei livelli di espressione del recettore CXCR4, rispetto alle cellule non migranti. Questa differenza si annulla quando l'UTP viene aggiunto al pozzetto superiore durante il saggio di migrazione. **(B)** Mediante marcatura intracitoplasmatica del recettore CXCR4 è stato dimostrato che la *down-regulation* di questo recettore è conseguenza di fenomeni di internalizzazione, attivati dal legame con CXCL12. Tale processo di internalizzazione viene tuttavia inibito dalla stimolazione con UTP.

Nel complesso, queste osservazioni suggeriscono che l'UTP possa incrementare il tasso di migrazione di cellule staminali CD34<sup>+</sup> attraverso l'inibizione dei processi che presiedono alla *down-regulation* ed internalizzazione del CXCR4.

Per analizzare più in dettaglio il ruolo dell'asse CXCL12/CXCR4 nella migrazione promossa dall'UTP, sono stati inoltre eseguiti esperimenti di inibizione del recettore CXCR4.

In un primo gruppo di esperimenti, cellule CD34<sup>+</sup> sono state pre-trattate con l'anticorpo anti-CXCR4 e successivamente utilizzate per saggi di migrazione. Come mostrato nella Figura 15,

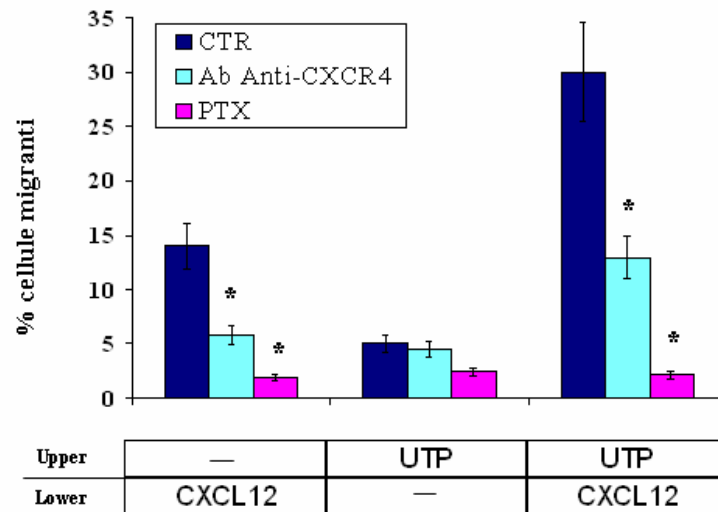
il trattamento con l'anticorpo anti-CXCR4 diminuisce del 57% la migrazione verso CXCL12, dimostrando che l'effetto esercitato dall'UTP può dipendere dallo stato di attivazione di CXCR4.

Ulteriori saggi di inibizione sono stati condotti in presenza della tossina di *Bordetella Pertussis* (Pertussis Toxin, PTX), nota per la sua capacità di bloccare ed inibire la subunità  $\alpha$  delle proteine G inibitorie ( $G_{\alpha i}$ ). Le proteine G rappresentano i principali mediatori della cascata trasduzionale del segnale attivata da recettori a sette eliche transmembrana, alla cui famiglia appartengono i recettori P2Y stessi, così come il recettore CXCR4.

In questa serie di esperimenti, il trattamento con PTX ha prodotto un'inibizione quasi totale (pari all'87%) della migrazione di cellule CD34<sup>+</sup> verso CXCL12. In cellule stimulate con UTP (ma in assenza di CXCL12) il tasso di migrazione ha subito un decremento del 48%, lasciando intuire (come del resto supportato da altri dati della letteratura), che la trasduzione del segnale dipendente dai recettori P2Y sia molto complessa e che le proteine G siano solo uno dei mediatori della cascata del segnale.

Infine, la tossina PTX è in grado di bloccare completamente (inibizione del 93%,  $p < 0.05$ ) la migrazione verso CXCL12 di cellule stimulate con UTP, come mostrato nella Figura 15.

Nel complesso, questi saggi di inibizione suggeriscono che la capacità dell'UTP di promuovere la migrazione di cellule CD34<sup>+</sup> dipende dalla cascata del segnale attivata da recettori P2Y associati a proteine  $G_{\alpha i}$  e che le stesse proteine  $G_{\alpha i}$  sono condivise dalla cascata trasduzionale di CXCR4.

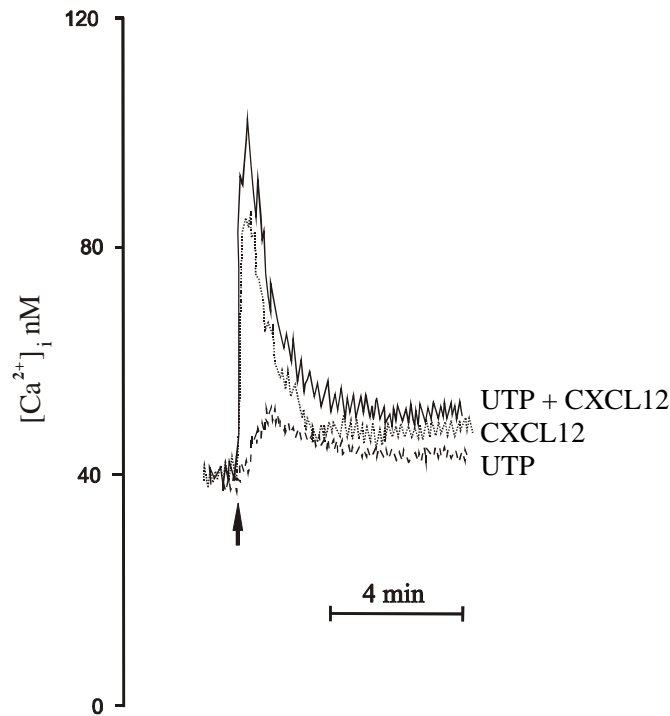


**Figura 15. Saggi di inibizione con tossina della pertosse (PTX) ed anticorpo anti-CXCR4.** Il trattamento con PTX (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inibisce quasi completamente la migrazione spontanea di cellule stimulate con UTP, nonché la migrazione dipendente da CXCL12. Inoltre, cellule incubate con l'anticorpo anti-CXCR4 mostrano un decremento nella risposta a gradienti di CXCL12, anche quando trattati con UTP.

### 3. Mobilizzazione intracellulare di ioni calcio.

Tra gli effetti biologici più precoci associati alla stimolazione di recettori P2Y vi è l'apertura dei canali per il calcio, con conseguente innalzamento della loro concentrazione intracitoplasmatica.

Come mostrato nella Figura 16, la stimolazione con UTP 10 $\mu\text{M}$  induce in cellule staminali CD34<sup>+</sup> un piccolo incremento, ma sostenuto nel tempo, di ioni calcio. Al contrario, il trattamento con CXCL12 induce un'alterazione della concentrazione molto più spiccata, ma di durata limitata. Infine, l'applicazione contemporanea di entrambi gli stimoli produce un picco di mobilizzazione del calcio di ampiezza ancora maggiore, identificando così nei meccanismi di regolazione di questo secondo messaggero, il calcio, un'ulteriore punto di contatto tra le vie di trasduzione di CXCR4 e dei recettori P2Y.



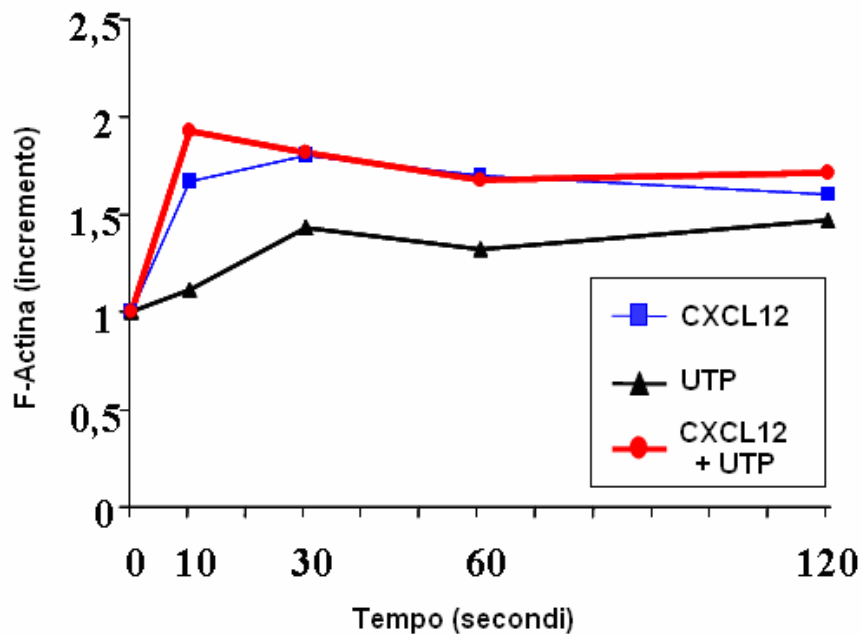
**Figura 16. Profilo di mobilizzazione intracellulare di ioni calcio.** L'applicazione dei diversi stimoli (indicata dalla freccia) produce diverse cinetiche di mobilizzazione del calcio intracellulare. In particolare, la stimolazione contemporanea di cellule CD34<sup>+</sup> con UTP e CXCL12 produce un picco di intensità e durata maggiori a quelle riscontrate in seguito all'applicazione dei due fattori separatamente.

#### 4. Polimerizzazione intracellulare dei filamenti di fibronectina.

Insieme alla mobilizzazione intracellulare degli ioni calcio, un altro fenomeno associato alle fasi prodromiche della risposta migratoria riguarda il riarrangiamento delle strutture citoscheletriche cellulari.

Nel presente studio sono state studiate per via citofluorimetrica le dinamiche di polimerizzazione dei filamenti di actina mediante l'utilizzo di falloidina marcata con isotiocianato di fluorescina (come descritto in Materiali e Metodi). La stimolazione con UTP

ha tuttavia prodotto, nelle nostre mani, solo un lieve e non statisticamente significativo incremento dei livelli di polimerizzazione già indotti dalla chemochina CXCL12 (Figura 17).



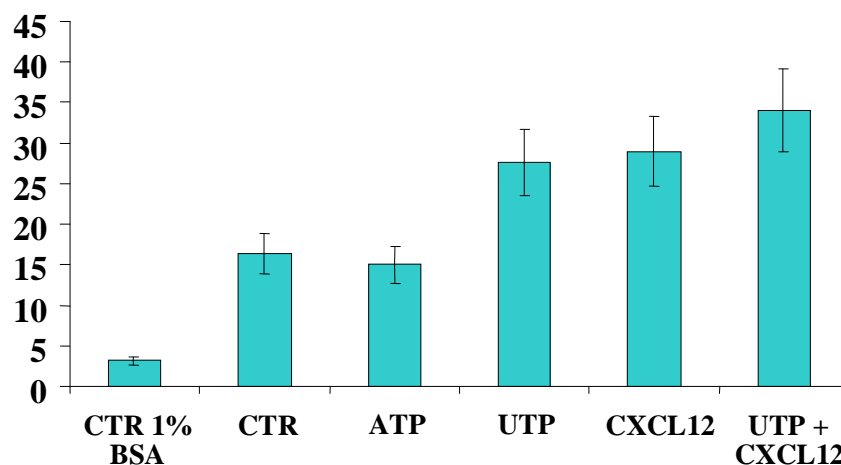
**Figura 17. Cinetiche di polimerizzazione intracellulare dei filamenti di actina.** Il riarrangiamento delle strutture citoscheletriche è stato studiato per via citofluorimetrica dopo trattamento con UTP, CXCL12 o con entrambi i fattori. Rispetto alla stimolazione con CXCL12, l'aggiunta di UTP produce solo un lieve incremento dei livelli di polimerizzazione dei filamenti di actina.

## 5. Saggio di adesione.

La capacità di una cellula di migrare direzionalmente è stata positivamente correlata, oltre che alla sua motilità intrinseca, anche alla capacità di aderire con i substrati circostanti, come la lamina basale o le proteine della matrice extracellulare. In particolare, una delle interazioni adesive emerse finora per il ruolo chiave che svolge nella migrazione di progenitori emopoietici è quella tra integrine e filamenti di fibronectina.

Utilizzando pozzetti di coltura coattati con fibronectina, è stata quindi saggiata la capacità dei nucleotidi extracellulari di modulare le proprietà adesive di progenitori emopoietici umani CD34<sup>+</sup>. Da questi studi è emerso che il pre-trattamento con ATP non influenza in modo significativo la percentuale di cellule CD34<sup>+</sup> aderenti al pozzetto. Al contrario, il trattamento con UTP ha incrementato notevolmente la quota di cellule aderenti ( $27,6 \pm 4,9\%$  contro il  $16,6 \pm 2,5\%$  del controllo negativo), fino a livelli paragonabili a quelli ottenuti con il CXCL12 stesso (Figura 18).

La combinazione di UTP e di CXCL12 non produce tuttavia alcun ulteriore aumento nella percentuale di cellule aderenti a fibronectina.

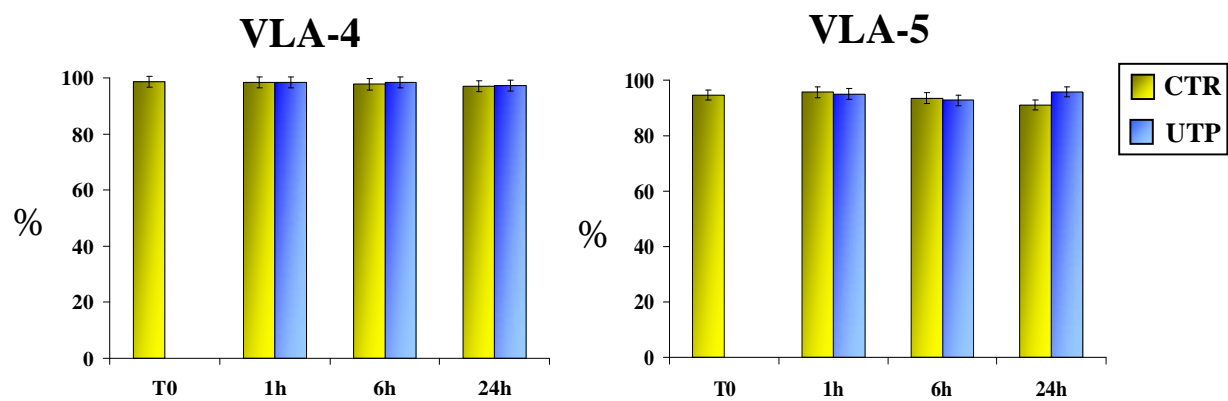


**Figura 18. Saggio di adesione.** Il trattamento di cellule emopoietiche CD34<sup>+</sup> con UTP (ma non con ATP) ne incrementa significativamente il potenziale di adesione a filamenti di fibronectina.

Parallelamente, è stata studiata per via citofluorimetrica la capacità dell'UTP di modificare i livelli di espressione delle integrine CD49d (VLA-4) e CD49e (VLA-5), recettori per la fibronectina. Tuttavia, non è stata osservata alcuna differenza significativa nei livelli di espressione di queste integrine dopo trattamento con UTP, né sulla popolazione CD34<sup>+</sup>

basale (vedi Figura 19), né nella sottopopolazione di cellule migranti (dopo saggio di migrazione, dati non mostrati).

Questi dati suggeriscono pertanto che l'UTP possa incrementare l'*homing* di cellule staminali emopoietiche potenziandone l'adesione a filamenti di fibronectina, pur non influenzando i livelli di espressione in membrana delle integrine CD49d e CD49e.



**Figura 19. Profilo di espressione dei recettori integrinici VLA-4 e VLA-5 in seguito a trattamento con UTP.** I livelli di espressione dei recettori VLA-4 e VLA-5 è stata studiata, per via citofluorimetrica, in cellule CD34<sup>+</sup> stimulate con UTP per diversi intervalli di tempo (un'ora, sei ore e ventiquattro ore). Da questa analisi non è tuttavia emersa alcuna differenza significativa nei livelli di espressione delle integrine di cellule trattate con UTP rispetto ai controlli non trattati.

## 6. Saggi di homing competitivo in vivo in topi NOD/SCID.

Al fine di valutare l'effetto del nucleotide UTP sulla migrazione di cellule staminali *in vivo*, sono stati condotti saggi di *homing* competitivo nel modello competitivo.



Topi NOD/SCID (sei animali per gruppo) sono stati sottoposti ad una dose subletale di radiazioni ed inoculati con cellule CD34<sup>+</sup> umane incubate per un'ora con UTP e, contemporaneamente, con cellule CD34<sup>+</sup> non stimulate.

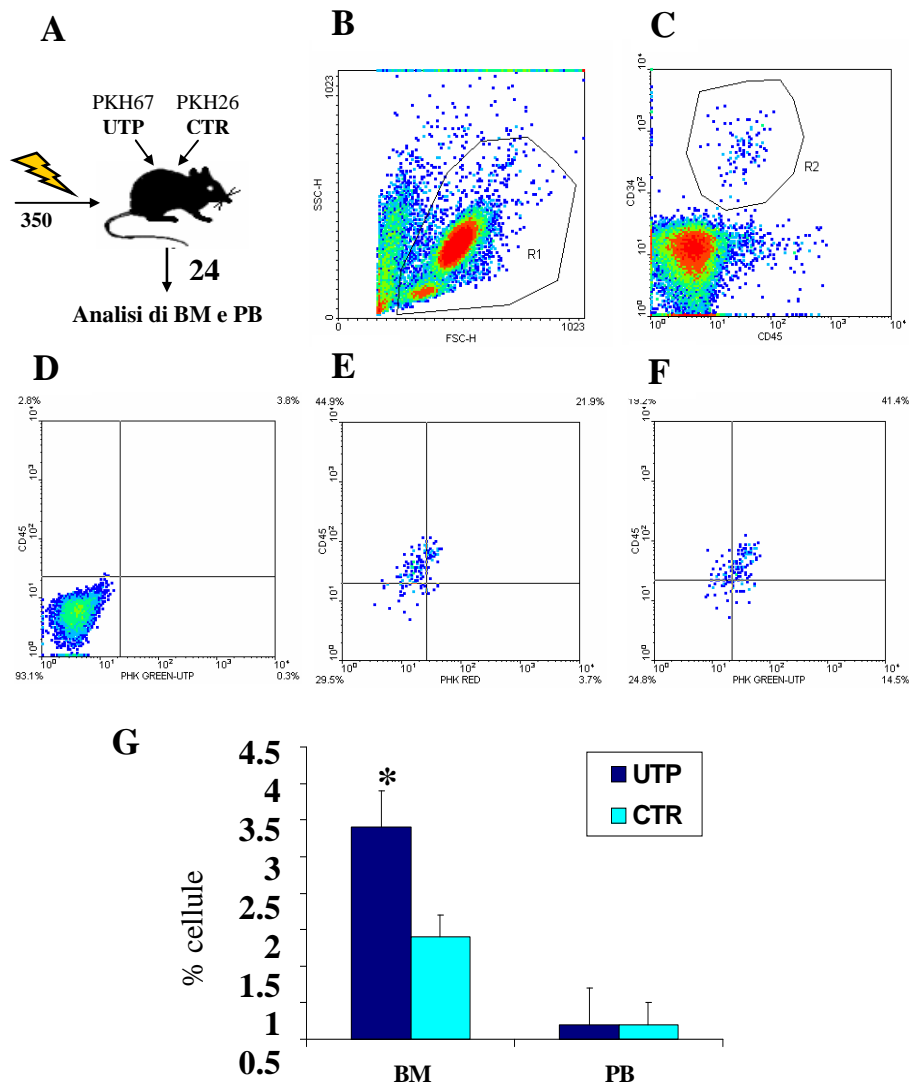
Scopo di questa analisi è paragonare, nello stesso animale da esperimento, il comportamento migratorio e la distribuzione *in vivo* di cellule stimulate con il nucleotide UTP e di cellule non trattate. Per tracciarne in modo differenziale la distribuzione, i due gruppi di cellule sono stati marcati prima della reinfusione con il colorante PKH, coniugato con isotiocianato di fluorescina (PKH67) o con ficoeritrina (PKH26), rispettivamente (come descritto in Materiali e Metodi ed in Figura 20A).

Dopo ventiquattro ore, midollo e sangue periferico degli animali trapiantati sono stati analizzati per via citofluorimetrica, per stimare la percentuale di cellule umane CD34<sup>+</sup> positive, rispettivamente, per PKH26 o PKH67 (Figura 20D-F).

Per quanto riguarda i campioni di sangue periferico, non è stata osservata alcuna differenza significativa nella percentuale di cellule trattate con UTP o di cellule del controllo negativo (Figura 20G). Al contrario, all'interno del compartimento midollare, la percentuale di cellule CD34<sup>+</sup> stimulate con UTP è risultata essere significativamente superiore alla percentuale di cellule non trattate ( $2,9 \pm 0,5\%$  contro il  $1,4 \pm 0,3\%$ ,  $p < 0,001$ ), come mostrato in figura 20G.

E' stato inoltre studiato l'effetto sui meccanismi di migrazione in seguito ad un prolungamento dei tempi di incubazione con UTP (sei ore e ventiquattro ore). In questa serie di esperimenti non sono tuttavia emerse differenze significative rispetto alla percentuale di *homing* rilevata dopo incubazione di un'ora.

Nell'insieme, gli esperimenti di *homing* competitivo mostrano che, analogamente a quanto visto *in vitro*, la stimolazione con UTP è in grado di incrementare la capacità migratoria e di *homing* di cellule staminali CD34<sup>+</sup> e che tale effetto stimolatorio si esplica anche con esposizioni di breve durata.



**Figura 20. Saggio di *homing* competitivo.** Topi NOD/SCID sono stati irradiati subletalmente e successivamente inoculati con cellule CD34<sup>+</sup> trattate con UTP e con cellule non stimulate (come descritto in dettaglio in Materiali e Metodi) e come schematizzato nel pannello A. I pannelli (B) e (C) mostrano la popolazione cellulare selezionata (CD34<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup>) dopo esclusione di cellule morte, piatrine e *debris* cellulari. (D) controllo negativo della marcatura. (E) Esempio rappresentativo del livello di fluorescenza di PKH in un campione di controllo. (F) Esempio rappresentativo del livello di fluorescenza di PKH in un campione di BM, dopo inoculo di cellule trattate con UTP.

## **7. Analisi del profilo trascrizionale di cellule umane CD34<sup>+</sup> in seguito a trattamento con UTP e CXCL12.**

Al fine di valutare quali modifiche produca la stimolazione con UTP a livello biomolecolare e quali vie di trasduzione del segnale vengano reclutate, sono state eseguite analisi dettagliate del profilo trascrizionale di cellule trattate con UTP.

In particolare, utilizzando il GeneChip HG-U133A di Affymetrix sono stati confrontati i *trascrittomi* di cellule non stimolate con quelli di cellule incubate con UTP da solo, con CXCL12 da solo e con la combinazione di entrambi i fattori. Tutti i dati sono stati depositati pubblicamente presso la banca dati *Gene Expression Omnibus MLAME*. I dati emersi da tale *screening* sono stati filtrati con la procedura descritta nella sezione *Materiali e Metodi* ed è stata così identificata una serie di geni il cui profilo trascrizionale è modulato in modo significativo dai diversi trattamenti (vedi tabelle a seguire).

**Increased UTP vs CTR**

<b>ProbeSet ID</b>	<b>Gene Title</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>Entrez Gene</b>
214657_s_at	Full-length cDNA clone CS0DI085YB07 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens	---	---
214757_at	CDNA clone IMAGE:3456494	---	---
215892_at	CDNA FLJ37420 fis, clone BRAWH2001186	---	---
217446_x_at	MRNA; cDNA DKFZp434M054 (from clone DKFZp434M054)	---	---
222207_x_at	CDNA: FLJ20949 fis, clone ADSE01902	---	---
213867_x_at	actin, beta	ACTB	60
208268_at	ADAM metallopeptidase domain 28	ADAM28	10863
205997_at	ADAM metallopeptidase domain 28	ADAM28	10863
205179_s_at	ADAM metallopeptidase domain 8	ADAM8	101
201401_s_at	adrenergic, beta, receptor kinase 1	ADRBK1	156
215336_at	A kinase (PRKA) anchor protein 11	AKAP11	11215
219834_at	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 8	ALS2CR8	79800
207629_s_at	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	ARHGEF2	9181
202547_s_at	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	ARHGEF7	8874
203264_s_at	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9	ARHGEF9	23229
208442_s_at	ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	ATM	472
210858_x_at	ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	ATM	472
220556_at	ATPase, (Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ) transporting, beta 4 polypeptide	ATP1B4	23439
214594_x_at	ATPase, Class I, type 8B, member 1	ATP8B1	5205
216286_at	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 6	B4GALT6	9331
215555_at	Chromosome 1 open reading frame 63	C1orf63	57035
214849_at	chromosome 6 open reading frame 69	C6orf69	222658
204716_at	coiled-coil domain containing 6	CCDC6	8030
205098_at	chemokine (C-C motif) receptor 1	CCR1	1230
208653_s_at	CD164 antigen, sialomucin	CD164	8763
204489_s_at	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	CD44	960
207176_s_at	CD80 antigen (CD28 antigen ligand 1, B7-1 antigen)	CD80	941
210743_s_at	CDC14 cell division cycle 14 homolog A (S. cerevisiae)	CDC14A	8556
210701_at	craniofacial development protein 1	CFDP1	10428
209508_x_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	8837
211862_x_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	8837
215318_at	hypothetical gene CG012	CG012	116829
220586_at	chromodomain helicase DNA binding protein 9	CHD9	80205
206184_at	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	CRKL	1399
207085_x_at	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)	CSF2RA	1438
214731_at	CTTNBP2 N-terminal like	CTTNBP2NL	55917
211031_s_at	cytoplasmic linker 2	CYLN2	7461
219290_x_at	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	DAPP1	27071
201211_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	DDX3X	1654
217208_s_at	discs, large homolog 1 (Drosophila)	DLG1	1739
211121_s_at	docking protein 1, 62kDa (downstream of tyrosine kinase 1)	DOK1	1796
214805_at	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	EIF4A1	1973
205521_at	Endonuclease G-like 1	ENDOGL1	9941
221664_s_at	F11 receptor	F11R	50848
215645_at	Folliculin	FLCN	201163
218155_x_at	hypothetical protein FLJ10534	FLJ10534	55720
220719_at	hypothetical protein FLJ13769	FLJ13769	80079
211299_s_at	flotillin 2	FLOT2	2319
217370_x_at	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	FUS	2521
210506_at	fucosyltransferase 7 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	FUT7	2529
222187_x_at	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein	G3BP	10146
211934_x_at	glucosidase, alpha; neutral AB	GANAB	23193
207966_s_at	golgi apparatus protein 1	GLG1	2734
215891_s_at	GM2 ganglioside activator	GM2A	2760
33646_g_at	GM2 ganglioside activator	GM2A	2760
208797_s_at	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8A	GOLGA8A	23015 /// 440270
213650_at	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8A	GOLGA8A	23015 /// 440270
214605_x_at	G protein-coupled receptor 1	GPR1	2825
207052_at	hepatitis A virus cellular receptor 1	HAVCR1	26762
217427_s_at	HIR histone cell cycle regulation defective homolog A (S. cerevisiae)	HIRA	7290
215666_at	major histocompatibility complex, class II, DR beta 4	HLA-DRB4	3126
207135_at	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	HTR2A	3356
212592_at	Immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	IGJ	3512
211027_s_at	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	IKBKB	3551
204864_s_at	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	IL6ST	3572
208164_s_at	interleukin 9 receptor	IL9R	3581 /// 400481
217212_s_at	interleukin 9 receptor	IL9R	3581 /// 400481
211072_x_at	tubulin, alpha, ubiquitous	K-ALPHA-1	10376
204307_at	KIAA0329	KIAA0329	9895
207730_x_at	KIAA1881	KIAA1881	114782
209234_at	kinesin family member 1B	KIF1B	23095
211519_s_at	kinesin family member 2C	KIF2C	11004
213623_at	kinesin family member 3A	KIF3A	11127
206551_x_at	kelch-like 24 (Drosophila)	KLHL24	54800
34031_i_at	KRIT1, ankyrin repeat containing	KRIT1	889
201551_s_at	lysosomal-associated membrane protein 1	LAMP1	3916
213089_at	hypothetical protein LOC153561	LOC153561	153561
81737_at	SLC7A5 pseudogene	LOC388221	388221 /// 440345

222145_at	Hypothetical protein LOC440345	LOC440345	440345
215090_x_at	hypothetical protein FLJ11822	LOC440434	440434
215079_at	LOC441207	LOC442522	442522
215063_x_at	leucine rich repeat containing 40	LRRC40	55631
211019_s_at	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	LSS	4047
216765_at	Mitogen-activated protein kinase kinase 5	MAP2K5	5607
211087_x_at	mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	1432
211574_s_at	membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)	MCP	4179
60815_at	hypothetical protein MGC13098	MGC13098	84820
214972_at	Meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	MGEA5	10724
213733_at	myosin IF	MYO1F	4542
221715_at	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3	MYST3	7994
209734_at	NCK-associated protein 1-like	NCKAP1L	3071
221628_s_at	cytokine-like nuclear factor n-pac	N-PAC	84656
206645_s_at	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	NR0B1	190
212307_s_at	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	OGT	8473
215179_x_at	Placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein	PGF	5228
221605_s_at	pipecolic acid oxidase	PIPOX	51268
206470_at	plexin C1	PLXNC1	10154
215281_x_at	pogo transposable element with ZNF domain	POGZ	23126
201602_s_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	PPP1R12A	4659
216915_s_at	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	PTPN12	5782
204469_at	protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1	PTPRZ1	5803
207419_s_at	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	RAC2	5880
209050_s_at	ral guanine nucleotide dissociation stimulator	RALGDS	5900
209051_s_at	ral guanine nucleotide dissociation stimulator	RALGDS	5900
214487_s_at	RAP2A, member of RAS oncogene family	RAP2A	5911 /// 5912
215201_at	RALBP1 associated Eps domain containing 1	REPS1	85021
218861_at	ring finger protein 25	RNF25	64320
214578_s_at	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	ROCK1	6093
211504_x_at	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2	ROCK2	9475
221943_x_at	Ribosomal protein L38	RPL38	6169
202792_s_at	SAPS domain family, member 2	SAPS2	9701
220791_x_at	sodium channel, voltage-gated, type XI, alpha	SCN11A	11280
209880_s_at	selectin P ligand	SELPLG	6404
64371_at	splicing factor, arginine/serine-rich 14	SFRS14	10147
220796_x_at	solute carrier family 35, member E1	SLC35E1	79939
215599_at	SMA4	SMA4	11039
206663_at	Sp4 transcription factor	SP4	6671
215383_x_at	spastic paraplegia 21 (autosomal recessive, Mast syndrome)	SPG21	51324
209875_s_at	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	SPP1	6696
203128_at	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	SPTLC2	9517
36019_at	serine/threonine kinase 19	STK19	8859
221638_s_at	syntaxin 16	STX16	8675
204743_at	transgelin 3	TAGLN3	29114
201109_s_at	thrombospondin 1	THBS1	7057
208246_x_at	Thymidine kinase 2, mitochondrial	TK2	7084
213254_at	trinucleotide repeat containing 6B	TNRC6B	23112
214196_s_at	tripeptidyl peptidase I	TPP1	1200
215220_s_at	translocated promoter region (to activated MET oncogene)	TPR	7175
216094_at	Wiskott-Aldrich syndrome-like	WASL	8976
201294_s_at	WD repeat and SOCS box-containing 1	WSB1	26118
201295_s_at	WD repeat and SOCS box-containing 1	WSB1	26118
212787_at	YLP motif containing 1	YLP1	56252
214715_x_at	zinc finger protein 160	ZNF160	90338
215359_x_at	zinc finger protein 44 (KOX 7)	ZNF44	51710
215012_at	zinc finger protein 451	ZNF451	26036
220704_at	zinc finger protein, subfamily 1A, 1 (Ikaros)	ZNF1A1	10320
216901_s_at	zinc finger protein, subfamily 1A, 1 (Ikaros)	ZNF1A1	10320

**Decreased UTP vs CTR**

ProbeSet ID	Gene Title	Gene Symbol	Entrez Gene
201043_s_at	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	ANP32A	8125
209406_at	BCL2-associated athanogene 2	BAG2	9532
48031_r_at	chromosome 5 open reading frame 4	C5orf4	10826
218384_at	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	CARHSP1	23589
203967_at	CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	CDC6	990
204159_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	CDKN2C	1031
213965_s_at	chromodomain helicase DNA binding protein 5	CHD5	26038
211136_s_at	cleft lip and palate associated transmembrane protein 1	CLPTM1	1209
214277_at	COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	COX11	1353 /// 140468
201906_s_at	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like	CTDSPL	10217
206336_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	CXCL6	6372
48808_at	dihydrofolate reductase	DHFR	1719
218585_s_at	denticleless homolog (Drosophila)	DTL	51514
204768_s_at	flap structure-specific endonuclease 1	FEN1	2237
209189_at	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	2353
203064_s_at	forkhead box K2	FOXK2	3607
210358_x_at	GATA binding protein 2	GATA2	2624
216860_s_at	growth differentiation factor 11	GDF11	10220

203560_at	gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolyglutamate hydrolase)	GGH	8836
203290_at	major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	HLA-DQA1	3117
205366_s_at	homeo box B6	HOXB6	3216
216973_s_at	homeo box B7	HOXB7	3217
214666_x_at	iron-responsive element binding protein 2	IREB2	3658
222328_x_at	Maternally expressed 3	MEG3	55384
204475_at	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1	4312
219368_at	nucleosome assembly protein 1-like 2	NAP1L2	4674
205129_at	nucleophosmin/nucleoplasmin, 3	NPM3	10360
221521_s_at	DNA replication complex GINS protein PSF2	Pfs2	51659
204228_at	peptidyl prolyl isomerase H (cyclophilin H)	PPIH	10465
219599_at	hypothetical protein PRO1843	PRO1843	55378
201140_s_at	RAB5C, member RAS oncogene family	RAB5C	5878
209544_at	receptor-interacting serine-threonine kinase 2	RIPK2	8767
205191_at	retinitis pigmentosa 2 (X-linked recessive)	RP2	6102
215479_at	Sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A	SEMA6A	57556
204978_at	splicing factor, arginine/serine-rich 16 (suppressor-of-white-apricot homolog, Drosophila)	SFRS16	11129
215169_at	solute carrier family 35, member E2	SLC35E2	9906
207308_at	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2	SLCO1A2	6579
201996_s_at	spen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	SPEN	23013
202840_at	TAF15 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 68kDa	TAF15	8148
209277_at	Tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	7980
205347_s_at	thymosin-like 8	TMSL8	11013
203844_at	von Hippel-Lindau tumor suppressor	VHL	7428
211962_s_at	zinc finger protein 36, C3H type-like 1	ZFP36L1	677

**Increased CXCL12 vs CTR**

ProbeSet ID	Gene Title	Gene Symbol	Entrez Gene
214657_s_at	Full-length cDNA clone CS0DI085YB07 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens	---	---
200727_s_at	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	ACTR2	10097
201401_s_at	adrenergic, beta, receptor kinase 1	ADRBK1	156
222024_s_at	A kinase (PRKA) anchor protein 13	AKAP13	11214
208353_x_at	ankyrin 1, erythrocytic	ANK1	286
215931_s_at	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (brefeldin A-inhibited)	ARFGEF2	10564
220658_s_at	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2	ARNTL2	56938
201679_at	arsenate resistance protein ARS2	ARS2	51593
214982_at	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1	ASCC3L1	23020
214594_x_at	ATPase, Class I, type 8B, member 1	ATP8B1	5205
211944_at	BAT2 domain containing 1	BAT2D1	23215
211833_s_at	BCL2-associated X protein	BAX	581
215037_s_at	BCL2-like 1	BCL2L1	598
201169_s_at	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	BHLHB2	8553
37170_at	BMP2 inducible kinase	BMP2K	55589
215509_s_at	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	BUB1	699
217448_s_at	chromosome 14 open reading frame 92	C14orf92	285412 /// 9878
212574_x_at	chromosome 19 open reading frame 6	C19orf6	91304
213986_s_at	chromosome 19 open reading frame 6	C19orf6	91304
220688_s_at	chromosome 1 open reading frame 33	C1orf33	51154
209927_s_at	chromosome 1 open reading frame 77	C1orf77	26097
219023_at	chromosome 4 open reading frame 16	C4orf16	55435
214849_at	chromosome 6 open reading frame 69	C6orf69	222658
208077_at	chromosome 9 open reading frame 38	C9orf38	29044
201950_x_at	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	CAPZB	832
207533_at	chemokine (C-C motif) ligand 1	CCL1	6346
216598_s_at	chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	6347
221463_at	chemokine (C-C motif) ligand 24	CCL24	6369
201743_at	CD14 antigen	CD14	929
203645_s_at	CD163 antigen	CD163	9332
211192_s_at	CD84 antigen (leukocyte antigen)	CD84	8832
208727_s_at	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	CDC42	998
214464_at	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)	CDC42BPA	8476
204126_s_at	CDC45 cell division cycle 45-like (S. cerevisiae)	CDC45L	8318
209508_x_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	8837
210563_x_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	8837
211862_x_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	8837
209258_s_at	chondroitin sulfate proteoglycan 6 (barnacan)	CSPG6	9126
215101_s_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5	6374
206336_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	CXCL6	6372
202434_s_at	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	CYP1B1	1545
208719_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	DDX17	10521
213998_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	DDX17	10521
201211_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked	DDX3X	1654
212105_s_at	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	DHX9	1660
212107_s_at	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	DHX9	1660
214693_x_at	hypothetical protein DJ328E19.C1.1	DJ328E19.C1.1	200030 /// 25832
217208_s_at	discs, large homolog 1 (Drosophila)	DLG1	1739
215252_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7	DNAJC7	7266
201694_s_at	early growth response 1	EGR1	1958
214805_at	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	EIF4A1	1973
201122_x_at	eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A	1984

201123_s_at	eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A	1984
213753_x_at	eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A	1984
201718_s_at	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	EPB41L2	2037
200841_s_at	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	EPRS	2058
204768_s_at	flap structure-specific endonuclease 1	FEN1	2237
204560_at	FK506 binding protein 5	FKBP5	2289
220458_at	hypothetical protein FLJ10246	FLJ10246	55104
218051_s_at	hypothetical protein FLJ12442	FLJ12442	64943
217370_x_at	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	FUS	2521
201514_s_at	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein	G3BP	10146
211934_x_at	glucosidase, alpha; neutral AB	GANAB	23193
215891_s_at	GM2 ganglioside activator	GM2A	2760
203676_at	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (Sanfilippo disease IIID)	GNS	2799
209170_s_at	glycoprotein M6B	GPM6B	2824
211543_s_at	G protein-coupled receptor kinase 6	GRK6	2870
210892_s_at	general transcription factor II, i	GTF2I	2969
217427_s_at	HIR histone cell cycle regulation defective homolog A (S. cerevisiae)	HIRA	7290
210457_x_at	high mobility group AT-hook 1	HMGA1	3159
220633_s_at	heterochromatin protein 1, binding protein 3	HP1BP3	50809
200806_s_at	heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	HSPD1	3329
201601_x_at	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	IFITM1	8519
214569_at	interferon, alpha 5	IFNA5	3442
211027_s_at	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta	IKKBK	3551
214398_s_at	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon	IKBKE	9641
208200_at	interleukin 1, alpha	IL1A	3552
203828_s_at	interleukin 32	IL32	9235
205798_at	interleukin 7 receptor	IL7R	3575
217212_s_at	interleukin 9 receptor	IL9R	3581 /// 400481
210511_s_at	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	INHBA	3624
213446_s_at	IQ motif containing GTPase activating protein 1	IQGAP1	8826
203163_at	katanin p80 (WD repeat containing) subunit B 1	KATNB1	10300
211519_s_at	kinesin family member 2C	KIF2C	11004
208960_s_at	Kruppel-like factor 6	KLF6	1316
219157_at	kelch-like 2, Mayven (Drosophila)	KLHL2	11275
209653_at	karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)	KPNA4	3840
201551_s_at	lysosomal-associated membrane protein 1	LAMP1	3916
205266_at	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	LIF	3976
81737_at	SLC7A5 pseudogene	LOC388221	388221 /// 440345
217712_at	Similar to Serine/threonine-protein kinase PRKX (Protein kinase PKX1)	LOC389906	389906
222145_at	Hypothetical protein LOC440345	LOC440345	440345
215079_at	LOC441207	LOC442522	442522
212113_at	hypothetical LOC552889	LOC552889	552889
211019_s_at	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	LSS	4047
202728_s_at	latent transforming growth factor beta binding protein 1	LTBP1	4052
210477_x_at	mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8	5599
200769_s_at	methionine adenosyltransferase II, alpha	MAT2A	4144
220651_s_at	MCM10 minichromosome maintenance deficient 10 (S. cerevisiae)	MCM10	55388
218600_at	hypothetical protein MGC10986	MGC10986	80774
214972_at	Meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	MGEA5	10724
219703_at	meiosis-specific nuclear structural 1	MNS1	55329
201521_s_at	nuclear cap binding protein subunit 2, 20kDa	NCBP2	22916
209734_at	NCK-associated protein 1-like	NCKAP1L	3071
211352_s_at	nuclear receptor coactivator 3	NCOA3	8202
214738_s_at	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 9	NEK9	91754
212808_at	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 interacting protein	NFATC2IP	84901
221628_s_at	cytokine-like nuclear factor n-pac	N-PAC	84656
201364_s_at	ornithine decarboxylase antizyme 2	OAZ2	4947
216804_s_at	PDZ and LIM domain 5	PDLIM5	10611
208983_s_at	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	PECAM1	5175
209193_at	pim-1 oncogene	PIM1	5292
211205_x_at	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, alpha	PIP5K1A	8394
201251_at	pyruvate kinase, muscle	PKM2	5315
202886_s_at	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), beta isoform	PPP2R1B	5519
201267_s_at	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 3	PSMC3	5702
212587_s_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	PTPRC	5788
214552_s_at	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1	RABEP1	9135
217857_s_at	RNA binding motif protein 8A	RBM8A	9939
210251_s_at	rap2 interacting protein x	RIPX	22902
221430_s_at	ring finger protein 146	RNF146	81847
216621_at	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	ROCK1	6093
221943_x_at	Ribosomal protein L38	RPL38	6169
201747_s_at	scaffold attachment factor B	SAFB	6294
215853_at	Serologically defined colon cancer antigen 8	SDCCAG8	10806
218681_s_at	stromal cell-derived factor 2-like 1	SDF2L1	23753
216147_at	Septin 11	SEP11	55752
201742_x_at	splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor)	SFRS1	6426
202236_s_at	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 1	SLC16A1	6566
218136_s_at	solute carrier family 25, member 37	SLC25A37	51312
201801_s_at	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	SLC29A1	2030
211819_s_at	sorbin and SH3 domain containing 1	SORBS1	10580

213205_s_at	KIAA0809 protein	SRISNF2L	23132
216684_s_at	synovial sarcoma translocation, chromosome 18	SS18	6760
208992_s_at	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	STAT3	6774
212009_s_at	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	STIP1	10963
213330_s_at	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	STIP1	10963
221638_s_at	syntaxin 16	STX16	8675
215459_at	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 3	TAX1BP3	30851
212758_s_at	transcription factor 8 (represses interleukin 2 expression)	TCF8	6935
215775_at	Thrombospondin 1	THBS1	7057
204426_at	transmembrane emp24 domain trafficking protein 2	TMED2	10959
209026_x_at	tubulin, beta polypeptide	TUBB	203068
209372_x_at	tubulin, beta 2	TUBB2	347733 /// 7280
209041_s_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2 (UBC7 homolog, yeast)	UBE2G2	7327
202316_x_at	ubiquitination factor E4B (UFD2 homolog, yeast)	UBE4B	10277
215533_s_at	ubiquitination factor E4B (UFD2 homolog, yeast)	UBE4B	10277
217234_s_at	villin 2 (ezrin)	VIL2	7430
215905_s_at	WD repeat domain 57 (U5 snRNP specific)	WDR57	9410
200641_s_at	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	YWHAZ	7534
214715_x_at	zinc finger protein 160	ZNF160	90338
220250_at	zinc finger protein 286	ZNF286	57335

**Decreased CXCL12 vs CTR**

ProbeSet ID	Gene Title	Gene Symbol	Entrez Gene
218395_at	ARF6 actin-related protein 6 homolog (yeast)	ACTR6	64431
220390_at	ATP/GTP binding protein-like 2	AGBL2	79841
202921_s_at	ankyrin 2, neuronal	ANK2	287
200602_at	amyloid beta (A4) precursor protein (peptidase nexin-II, Alzheimer disease)	APP	351
218501_at	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3	ARHGEF3	50650
213106_at	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), Class I, type 8A, member 1	ATP8A1	10396
204516_at	ataxin 7	ATXN7	6314
218043_s_at	5-azacytidine induced 2	AZI2	64343
204129_at	B-cell CLL/lymphoma 9	BCL9	607
221762_s_at	chromosome 20 open reading frame 67	C20orf67	63935
207701_at	chromosome 22 open reading frame 24	C22orf24	25775
220088_at	complement component 5 receptor 1 (C5a ligand)	C5R1	728
204024_at	chromosome 8 open reading frame 1	C8orf1	734
220050_at	chromosome 9 open reading frame 9	C9orf9	11092
218384_at	calcium regulated heat stable protein 1, 24kDa	CARHSP1	23589
222156_x_at	cell cycle progression 1	CCPG1	9236
205567_at	carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1	CHST1	8534
213499_at	chloride channel 2	CLCN2	1181
211136_s_at	cleft lip and palate associated transmembrane protein 1	CLPTM1	1209
206818_s_at	cyclin M2	CNNM2	54805
212489_at	collagen, type V, alpha 1	COL5A1	1289
210687_at	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)	CPT1A	1374
212901_s_at	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 2, 64kDa, tau variant	CSTF2T	23283
202901_x_at	cathepsin S	CTSS	1520
207608_x_at	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	CYP1A2	1544
222233_s_at	DNA cross-link repair 1C (PSO2 homolog, S. cerevisiae)	DCLRE1C	64421
221596_s_at	hypothetical protein DKFZp564O0523	DKFZP564O0523	84060
202500_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2	DNAJB2	3300
220320_at	docking protein 3	DOK3	79930
204646_at	dihydropyrimidine dehydrogenase	DPYD	1806
201436_at	eukaryotic translation initiation factor 4E	EIF4E	1977
202221_s_at	E1A binding protein p300	EP300	2033
203420_at	family with sequence similarity 8, member A1	FAM8A1	51439
207739_s_at	G antigen 1	GAGE1	2543 /// 2574
218871_x_at	chondroitin sulfate GalNAcT-2	GALNACT-2	55454
216973_s_at	homeo box B7	HOXB7	3217
216738_at	Histamine receptor H1	HRH1	3269
210253_at	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa	HTATIP2	10553
202146_at	interferon-related developmental regulator 1	IFRD1	3475
205992_s_at	interleukin 15	IL15	3600
204301_at	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11	KBTBD11	9920
219287_at	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	KCNMB4	27345
203584_at	KIAA0103	KIAA0103	9694
213234_at	KIAA1467 protein	KIAA1467	57613
213725_x_at	hypothetical protein LOC283824	LOC283824	283824
206584_at	lymphocyte antigen 96	LY96	23643
212449_s_at	lysophospholipase I	LYPLA1	10434
211370_s_at	mitogen-activated protein kinase kinase 5	MAP2K5	5607
203640_at	muscleblind-like 2 (Drosophila)	MBNL2	10150
204959_at	myeloid cell nuclear differentiation antigen	MNDA	4332
212867_at	Nuclear receptor coactivator 2	NCOA2	10499
202876_s_at	pre-B-cell leukemia transcription factor 2	PBX2	5089
212406_s_at	protein-L-isocarpate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2	PCMTD2	55251
212230_at	phosphatidic acid phosphatase type 2B	PPAP2B	8613
215959_at	hypothetical protein PRO1843	PRO1843	55378
209334_s_at	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9	PSMD9	5715
203581_at	RAB4A, member RAS oncogene family	RAB4A	5867



201140_s_at	RAB5C, member RAS oncogene family	RAB5C	5878
201156_s_at	RAB5C, member RAS oncogene family	RAB5C	5878
209284_s_at	retinoblastoma-associated protein 140	RAP140	23272
201486_at	reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain	RCN2	5955
211753_s_at	relaxin 1	RLN1	6013
208924_at	ring finger protein 11	RNF11	26994
218301_at	arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)-like 1	RNPEPL1	57140
217559_at	ribosomal protein L10-like	RPL10L	140801
216580_at	ribosomal protein L7	RPL7	388401 /// 389305
206306_at	ryanodine receptor 3	RYR3	6263
202375_at	SEC24 related gene family, member D (S. cerevisiae)	SEC24D	9871
215479_at	Sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A	SEMA6A	57556
201427_s_at	selenoprotein P, plasma, 1	SEPP1	6414
205352_at	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1	SERPIN1	5274
204978_at	splicing factor, arginine/serine-rich 16 (suppressor-of-white-apricot homolog, Drosophila)	SFRS16	11129
220474_at	solute carrier family 25 (mitochondrial oxodicarboxylate carrier), member 21	SLC25A21	89874
207308_at	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2	SLCO1A2	6579
213665_at	SRY (sex determining region Y)-box 4	SOX4	6659
200795_at	SPARC-like 1 (mast9, hev1n)	SPARCL1	8404
201996_s_at	spen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	SPEN	23013
204675_at	steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1	SRD5A1	6715
202693_s_at	serine/threonine kinase 17a (apoptosis-inducing)	STK17A	9263
204653_at	transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)	TFAP2A	7020
209277_at	Tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	7980
201110_s_at	thrombospondin 1	THBS1	7057
221748_s_at	tensin 1	TNS1	7145
220623_s_at	testis specific, 10	TSGA10	80705
212928_at	TSPY-like 4	TSPYL4	23270
203690_at	tubulin, gamma complex associated protein 3	TUBGCP3	10426
201177_s_at	SUMO-1 activating enzyme subunit 2	UBA2	10054
207349_s_at	uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)	UCP3	7352
202664_at	Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein	WASPIP	7456
213836_s_at	WD40 repeat protein interacting with phosphoinositides of 49kDa	WIPI49	55062
212637_s_at	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	WWP1	11059
207338_s_at	zinc finger protein 200	ZNF200	7752
206900_x_at	zinc finger protein 253	ZNF253	114977 /// 56242
207219_at	zinc finger protein 643	ZNF643	65243

**Increased UTP+CXCL12 vs CTR**

ProbeSet ID	Gene Title	Gene Symbol	Entrez Gene
215465_at	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 12	ABCA12	26154
213867_x_at	actin, beta	ACTB	60
200727_s_at	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	ACTR2	10097
205997_at	ADAM metallopeptidase domain 28	ADAM28	10863
205179_s_at	ADAM metallopeptidase domain 8	ADAM8	101
201401_s_at	adrenergic, beta, receptor kinase 1	ADRBK1	156
222024_s_at	A kinase (PRKA) anchor protein 13	AKAP13	11214
208353_x_at	ankyrin 1, erythrocytic	ANK1	286
207629_s_at	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	ARHGEF2	9181
202547_s_at	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	ARHGEF7	8874
203264_s_at	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9	ARHGEF9	23229
217818_s_at	actin related protein 2/3 complex, subunit 4, 20kDa	ARPC4	10093
211944_at	BAT2 domain containing 1	BAT2D1	23215
206665_s_at	BCL2-like 1	BCL2L1	598
204860_s_at	baculoviral IAP repeat-containing 1	BIRC1	4671
206133_at	XIAP associated factor-1	BIRC4BP	54739
208677_s_at	basigin (OK blood group)	BSG	682
217448_s_at	chromosome 14 open reading frame 92	C14orf92	285412 /// 9878
213986_s_at	chromosome 19 open reading frame 6	C19orf6	91304
208747_s_at	complement component 1, s subcomponent	C1S	716
201950_x_at	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	CAPZB	832
204716_at	coiled-coil domain containing 6	CCDC6	8030
216598_s_at	chemokine (C-C motif) ligand 2	CCL2	6347
221463_at	chemokine (C-C motif) ligand 24	CCL24	6369
205098_at	chemokine (C-C motif) receptor 1	CCR1	1230
201743_at	CD14 antigen	CD14	929
203645_s_at	CD163 antigen	CD163	9332
208653_s_at	CD164 antigen, sialomucin	CD164	8763
204489_s_at	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	CD44	960
211192_s_at	CD84 antigen (leukocyte antigen)	CD84	8832
208727_s_at	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	CDC42	998
214464_at	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)	CDC42BPA	8476
211862_x_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	8837
206207_at	Charcot-Leyden crystal protein	CLC	1178
206184_at	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	CRKL	1399
209258_s_at	chondroitin sulfate proteoglycan 6 (bamacan)	CSPG6	9126
210257_x_at	cullin 4B	CUL4B	8450
211031_s_at	cytoplasmic linker 2	CYLN2	7461
202434_s_at	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	CYP1B1	1545
202436_s_at	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	CYP1B1	1545

201082_s_at	dynactin 1 (p150, glued homolog, Drosophila)	DCTN1	1639
213998_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	DDX17	10521
216212_s_at	dyskeratosis congenita 1, dyskerin	DKC1	1736
201694_s_at	early growth response 1	EGR1	1958
204211_x_at	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	EIF2AK2	5610
200596_s_at	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 theta, 150/170kDa	EIF3S10	8661
214805_at	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 1	EIF4A1	1973
201718_s_at	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	EPB41L2	2037
221664_s_at	F11 receptor	F11R	50848
211825_s_at	Friend leukemia virus integration 1	FLI1	2313
211299_s_at	flotillin 2	FLOT2	2319
210506_at	fucosyltransferase 7 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	FUT7	2529
205285_s_at	FYN binding protein (FYB-120/130)	FYB	2533
205483_s_at	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	G1P2	9636
204415_at	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-6-16)	G1P3	2537
211934_x_at	glucosidase, alpha; neutral AB	GANAB	23193
207966_s_at	golgi apparatus protein 1	GLG1	2734
215891_s_at	GM2 ganglioside activator	GM2A	2760
33646_g_at	GM2 ganglioside activator	GM2A	2760
35820_at	GM2 ganglioside activator	GM2A	2760
211543_s_at	G protein-coupled receptor kinase 6	GRK6	2870
210164_at	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	GZMB	3002
219352_at	hect domain and RLD 6	HERC6	55008
210457_x_at	high mobility group AT-hook 1	HMGAI	3159
202072_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRPL	3191
220633_s_at	heterochromatin protein 1, binding protein 3	HP1BP3	50809
207135_at	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A	HTR2A	3356
214453_s_at	interferon-induced protein 44	IFI44	10561
204439_at	interferon-induced protein 44-like	IFI44L	10964
203153_at	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFIT1	3434
204747_at	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	IFIT3	3437
214022_s_at	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	IFITM1	8519
201601_x_at	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	IFITM1	8519
212592_at	Immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	IGJ	3512
211000_s_at	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)	IL6ST	3572
205798_at	interleukin 7 receptor	IL7R	3575
208930_s_at	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	ILF3	3609
210350_x_at	inhibitor of growth family, member 1	ING1	3621
213446_s_at	IQ motif containing GTPase activating protein 1	IQGAP1	8826
208436_s_at	interferon regulatory factor 7	IRF7	3665
203882_at	interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa	ISGF3G	10379
211072_x_at	tubulin, alpha, ubiquitous	K-ALPHA-1	10376
203163_at	katanin p80 (WD repeat containing) subunit B 1	KATNB1	10300
200922_at	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1	KDELRL1	10945
209234_at	kinesin family member 1B	KIF1B	23095
208960_s_at	Kruppel-like factor 6	KLF6	1316
34031_i_at	KRIT1, ankyrin repeat containing	KRIT1	889
201551_s_at	lysosomal-associated membrane protein 1	LAMP1	3916
205266_at	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)	LIF	3976
215123_at	hypothetical protein 348162	LOC348162	348162
216384_x_at	similar to prothymosin alpha	LOC440085	440085
211019_s_at	lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)	LSS	4047
207339_s_at	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	LTB	4050
202728_s_at	latent transforming growth factor beta binding protein 1	LTBP1	4052
202145_at	lymphocyte antigen 6 complex, locus E	LY6E	4061
217921_at	Mannosidase, alpha, class 1A, member 2	MAN1A2	10905
211087_x_at	mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	1432
211574_s_at	membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)	MCP	4179
202086_at	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	MX1	4599
204994_at	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	MX2	4600
212364_at	myosin IB	MYO1B	4430
213733_at	myosin IF	MYO1F	4542
211874_s_at	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 4	MYST4	23522
214496_x_at	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 4	MYST4	23522
209734_at	NCK-associated protein 1-like	NCKAP1L	3071
211352_s_at	nuclear receptor coactivator 3	NCOA3	8202
214738_s_at	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 9	NEK9	91754
201159_s_at	N-myristoyltransferase 1	NMT1	4836
206038_s_at	nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2	NR2C2	7182
202869_at	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	OAS1	4938
205552_s_at	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	OAS1	4938
204972_at	2',5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	OAS2	4939
206553_at	2',5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	OAS2	4939
218400_at	2',5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	OAS3	4940
216804_s_at	PDZ and LIM domain 5	PDLIM5	10611
208983_s_at	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	PECAM1	5175
201251_at	pyruvate kinase, muscle	PKM2	5315
206470_at	plexin C1	PLXNC1	10154
201602_s_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12A	PPP1R12A	4659
209162_s_at	PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog (yeast)	PRPF4	9128

217494_s_at	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1), pseudogene 1	PTENP1	11191
200772_x_at	prothymosin, alpha (gene sequence 28)	PTMA	5757
211921_x_at	prothymosin, alpha (gene sequence 28)	PTMA	5757
216915_s_at	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	PTPN12	5782
212587_s_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	PTPRC	5788
203223_at	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1	RABEP1	9135
214552_s_at	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1	RABEP1	9135
207419_s_at	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	RAC2	5880
209050_s_at	ral guanine nucleotide dissociation stimulator	RALGDS	5900
209051_s_at	ral guanine nucleotide dissociation stimulator	RALGDS	5900
214487_s_at	RAP2A, member of RAS oncogene family	RAP2A	5911 /// 5912
210251_s_at	rap2 interacting protein x	RIPX	22902
214578_s_at	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	ROCK1	6093
211504_x_at	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2	ROCK2	9475
213797_at	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	RSAD2	91543
202792_s_at	SAPS domain family, member 2	SAPS2	9701
209880_s_at	selectin P ligand	SELPLG	6404
200687_s_at	splicing factor 3b, subunit 3, 130kDa	SF3B3	23450
203760_s_at	Src-like adaptor	SLA	6503
212257_s_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2	SMARCA2	6595
209875_s_at	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	SPP1	6696
203128_at	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	SPTLC2	9517
216684_s_at	synovial sarcoma translocation, chromosome 18	SS18	6760
208992_s_at	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	STAT3	6774
216711_s_at	TAF1 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 250kDa	TAF1	6872
212758_s_at	transcription factor 8 (represses interleukin 2 expression)	TCF8	6935
201109_s_at	thrombospondin 1	THBS1	7057
212994_at	THO complex 2	THOC2	57187
212208_at	thyroid hormone receptor associated protein 2	THRAP2	23389
209226_s_at	transportin 1	TNPO1	3842
209026_x_at	tubulin, beta polypeptide	TUBB	203068
209372_x_at	tubulin, beta 2	TUBB2	347733 /// 7280
201009_s_at	thioredoxin interacting protein	TXNIP	10628
215533_s_at	ubiquitination factor E4B (UFD2 homolog, yeast)	UBE4B	10277
221735_at	WD repeat domain 48	WDR48	57599
217785_s_at	SNARE protein Ykt6	YKT6	10652
212787_at	YLP motif containing 1	YLPM1	56252
217717_s_at	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide	YWHA8	7529
216983_s_at	zinc finger protein 224	ZNF224	7767
216901_s_at	zinc finger protein, subfamily 1A, 1 (Ikaros)	ZNFN1A1	10320

**Decreased UTP+CXCL12 vs CTR**

ProbeSet ID	Gene Title	Gene Symbol	Entrez Gene
215528_at	MRNA; cDNA DKFZp586O1318 (from clone DKFZp586O1318)	---	---
202850_at	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	ABCD3	5825
209028_s_at	abl-interactor 1	ABI1	10006
207845_s_at	anaphase promoting complex subunit 10	ANAPC10	10393
218769_s_at	ankyrin repeat, family A (RFKANK-like), 2	ANKRA2	57763
201243_s_at	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 1 polypeptide	ATP1B1	481
200776_s_at	basic leucine zipper and W2 domains 1	BZW1	151579 /// 9689
222266_at	Chromosome 19 open reading frame 2	C19orf2	8725
218081_at	chromosome 20 open reading frame 27	C20orf27	54976
220918_at	chromosome 21 open reading frame 96	C21orf96	80215
213499_at	chloride channel 2	CLCN2	1181
201640_x_at	cleft lip and palate associated transmembrane protein 1	CLPTM1	1209
211136_s_at	cleft lip and palate associated transmembrane protein 1	CLPTM1	1209
202901_x_at	cathepsin S	CTSS	1520
215147_at	CDNA FLJ35626 fis, clone SPLEN2011086	CUGBP2	10659
222233_s_at	DNA cross-link repair 1C (PSO2 homolog, S. cerevisiae)	DCLRE1C	64421
202534_x_at	dihydrofolate reductase	DHFR	1719
221596_s_at	hypothetical protein DKFZp564O0523	DKFZP564O0523	84060
213092_x_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 9	DNAJC9	23234
220320_at	docking protein 3	DOK3	79930
204271_s_at	endothelin receptor type B	EDNRB	1910
212225_at	eukaryotic translation initiation factor 1	EIF1	10209
204398_s_at	echinoderm microtubule associated protein like 2	EML2	24139
219017_at	ethanolamine kinase 1	ETNK1	55500
216682_s_at	family with sequence similarity 48, member A	FAM48A	55578
219525_at	hypothetical protein FLJ10847	FLJ10847	55244
220467_at	hypothetical protein FLJ21272	FLJ21272	80100
215143_at	Hypothetical protein FLJ36166	FLJ36166	349152
215245_x_at	fragile X mental retardation 1	FMR1	2332
215221_at	Forkhead box P1	FOXP1	27086
215584_at	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	HECW1	23072
209786_at	high mobility group nucleosomal binding domain 4	HMGN4	10473
216973_s_at	homeo box B7	HOXB7	3217
216738_at	Histamine receptor H1	HRH1	3269
209448_at	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa	HTATIP2	10553
206295_at	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	IL18	3606
36612_at	KIAA0280 protein	KIAA0280	23201

214295_at	KIAA0485 protein	KIAA0485	57235
215268_at	KIAA0754 protein	KIAA0754	23056
213233_s_at	kelch-like 9 (Drosophila)	KLHL9	55958
201088_at	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	KPNA2	3838
209894_at	leptin receptor	LEPR	3953
213212_x_at	hypothetical protein LOC161527	LOC161527	161527
205668_at	lymphocyte antigen 75	LY75	4065
218918_at	mannosidase, alpha, class 1C, member 1	MAN1C1	57134
207098_s_at	mitofusin 1	MFN1	55669
213605_s_at	(clone CB1) mRNA fragment	MGC22265	349035
222306_at	Hypothetical protein MGC61571	MGC61571	152100
204475_at	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	MMP1	4312
213306_at	multiple PDZ domain protein	MPDZ	8777
210210_at	myelin protein zero-like 1	MPZL1	9019
217274_x_at	myosin, light polypeptide 4, alkali; atrial, embryonic	MYL4	4635
204684_at	neuronal pentraxin I	NPTX1	4884
204622_x_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	NR4A2	4929
217617_at	Pre-B-cell leukemia transcription factor 1	PBX1	5087
203793_x_at	polycomb group ring finger 2	PCGF2	7703
221899_at	Hypothetical gene CG012	PFAAP5	10443
222371_at	Protein inhibitor of activated STAT, 1	PIAS1	8554
207943_x_at	pleiomorphic adenoma gene-like 1	PLAGL1	5325
202620_s_at	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	PLOD2	5352
210946_at	phosphatidic acid phosphatase type 2A	PPAP2A	8611
204507_s_at	protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory subunit B, 19kDa, alpha isoform (calcineurin B, type I)	PPP3R1	5534
219599_at	hypothetical protein PRO1843	PRO1843	55378
201140_s_at	RAB5C, member RAS oncogene family	RAB5C	5878
213784_at	RAB, member of RAS oncogene family-like 4	RABL4	11020
215652_at	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	SDHD	6392
204051_s_at	secreted frizzled-related protein 4	SFRP4	6424
215639_at	SH2 domain containing 3C	SH2D3C	10044
205768_s_at	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2	SLC27A2	11001
215169_at	solute carrier family 35, member E2	SLC35E2	9906
212292_at	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1	SLC7A1	6541
200071_at	survival motor neuron domain containing 1	SMNDC1	10285
213665_at	SRY (sex determining region Y)-box 4	SOX4	6659
213168_at	Sp3 transcription factor	SP3	6670
219443_at	taspace, threonine aspartase, 1	TASP1	55617
212762_s_at	transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box)	TCF7L2	6934
204653_at	transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)	TFAP2A	7020
209277_at	Tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2	7980
202687_s_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	8743
221642_at	three prime repair exonuclease 1	TREX1	11277
206425_s_at	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 3	TRPC3	7222
222357_at	zinc finger and BTB domain containing 20	ZBTB20	26137
213452_at	zinc finger protein 184 (Kruppel-like)	ZNF184	7738
220117_at	zinc finger protein 659	ZNF659	79750

L'analisi di *microarray*, nell'insieme, suggerisce tuttavia che il livello di complessità del trascrittoma rimanga sostanzialmente invariato. Infatti, il numero di sequenze classificate come “presenti” dall'algoritmo di analisi rimane nel complesso il medesimo, tanto nelle cellule trattate, quanto nel gruppo del controllo negativo.

Successivamente, utilizzando DAVID TOOL 2.1 Beta, è stato possibile stabilire le categorie GO (*Gene Ontology*) che vengono modulate in modo più significativo dal trattamento con UTP. Come elencato nelle tabelle successive, molti geni il cui profilo trascrizionale viene modulato positivamente dal trattamento con UTP o CXCL12 appartengono alle categorie inerenti alla “*Motilità cellulare*”, alla “*Riorganizzazione e biogenesi del citoscheletro*”, nonché alla categoria di “*Adesione cellulare*”.

In particolare, il trattamento con UTP da solo o combinato con CXCL12 sembra incrementare in modo significativo la trascrizione dei geni appartenenti alle categorie “*Trasduzione del segnale mediata da piccole GTPasi*” e “*Trasduzione del segnale dipendente da proteine Rho*” (tabelle a seguire).

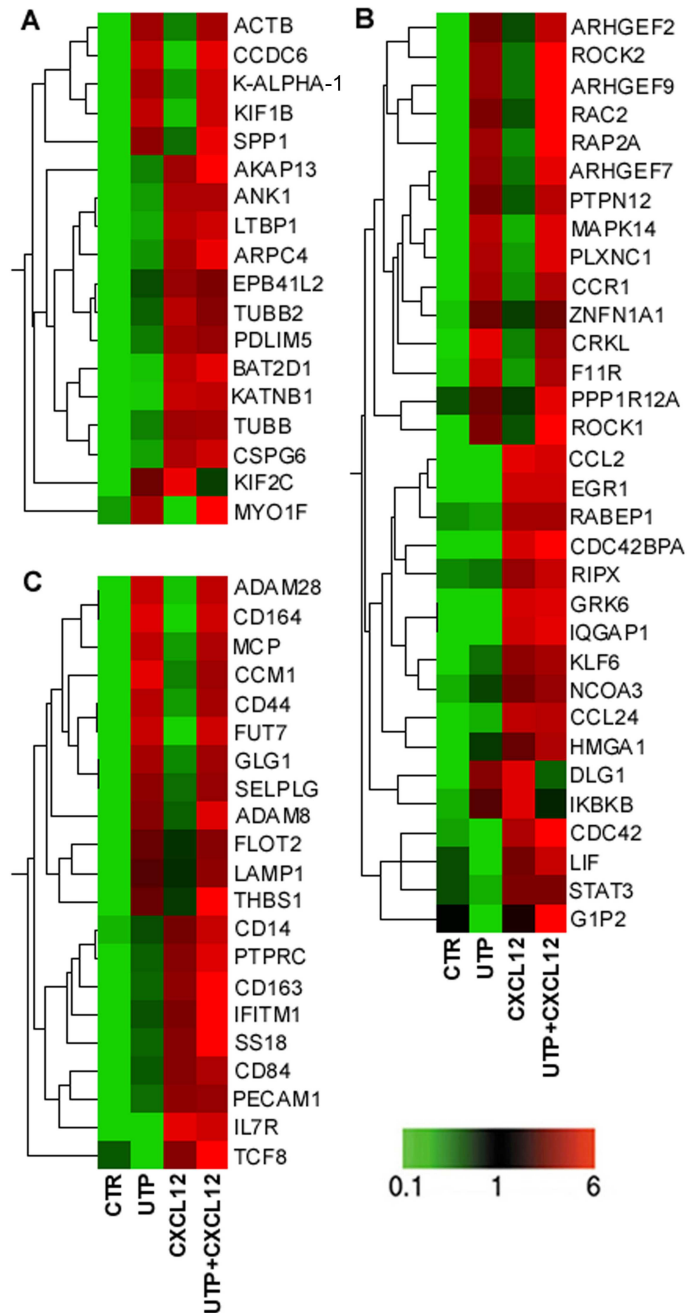
<b>Geni attivati in UTP vs CTR</b>	<b>P</b>
PROTEIN MODIFICATION	0.0033981
CELLULAR PROTEIN METABOLISM	0.0050328
SMALL GTPASE MEDIATED SIGNAL TRANSDUCTION	0.0054473
PROTEIN AMINO ACID PHOSPHORYLATION	0.0060655
CELLULAR MACROMOLECULE METABOLISM	0.0094418
MACROMOLECULE METABOLISM	0.0170178
CELL MOTILITY	0.0172551
CYTOSKELETON ORGANIZATION AND BIOGENESIS	0.0209587
CELL ADHESION	0.0280545
PHOSPHATE METABOLISM	0.0282988
PROTEIN KINASE CASCADE	0.0329241
M PHASE	0.042848
RHO PROTEIN SIGNAL TRANSDUCTION	0.0429291
INTRACELLULAR SIGNALING CASCADE	0.0614383

<b>Geni attivati in CXCL12 vs CTR</b>	<b>p</b>
CELLULAR PHYSIOLOGICAL PROCESS	3.091E-06
CELL PROLIFERATION	4.445E-06
M PHASE	5.348E-05
RESPONSE TO STRESS	0.0001385
CELLULAR METABOLISM	0.0002092
M PHASE OF MITOTIC CELL CYCLE	0.0003268
CELL ORGANIZATION AND BIOGENESIS	0.000481
MITOTIC CELL CYCLE	0.0007394
CELLULAR PROCESS	0.0007804
ORGANELLE ORGANIZATION AND BIOGENESIS	0.000853
PROTEIN POLYMERIZATION	0.0097643
CYTOSKELETON ORGANIZATION AND BIOGENESIS	0.0102631
REGULATION OF CELL CYCLE	0.0168704
CELL ADHESION	0.0172444
CYTOKINESIS	0.0252557
CELL MOTILITY	0.0273907
REGULATION OF PHYSIOLOGICAL PROCESS	0.029634
PROTEIN AMINO ACID PHOSPHORYLATION	0.0306423
CHEMOTAXIS	0.031909
TAXIS	0.031909
PHYSIOLOGICAL PROCESS	0.0332323
RESPONSE TO ABIOTIC STIMULUS	0.0362744
PROTEIN METABOLISM	0.0447012
MICROTUBULE CYTOSKELETON ORGANIZATION AND BIOGENESIS	0.0447079
MICROTUBULE POLYMERIZATION OR DEPOLYMERIZATION	0.0449282
DNA REPLICATION CHECKPOINT	0.0461497

<b>Geni attivati in UTP+CXCL12 vs CTR</b>	<b>P</b>
RESPONSE TO STRESS	1.814E-05
RESPONSE TO EXTERNAL BIOTIC STIMULUS	6.131E-05
CELL PROLIFERATION	0.0003327
SMALL GTPASE MEDIATED SIGNAL TRANSDUCTION	0.0004524
CELLULAR METABOLISM	0.0004758
CELL CYCLE	0.0011087
MITOTIC CELL CYCLE	0.0016903
CELLULAR PROTEIN METABOLISM	0.0017588
PROTEIN METABOLISM	0.0020814
CYTOSKELETON ORGANIZATION AND BIOGENESIS	0.0022098
CELLULAR MACROMOLECULE METABOLISM	0.0022742
PROTEIN AMINO ACID PHOSPHORYLATION	0.002519
INTRACELLULAR SIGNALING CASCADE	0.0037605
MACROMOLECULE METABOLISM	0.0050845
CELL ORGANIZATION AND BIOGENESIS	0.0052383
ACTIN CYTOSKELETON ORGANIZATION AND BIOGENESIS	0.0065587
RESPONSE TO WOUNDING	0.0075663
CYTOKINESIS	0.0087612
ACTIN FILAMENT-BASED PROCESS	0.0097048
RESPONSE TO EXTERNAL STIMULUS	0.0128965
M PHASE	0.0131768
CELL MOTILITY	0.019059
TRANSCRIPTION INITIATION	0.0190722
INFLAMMATORY RESPONSE	0.0216106
RHO PROTEIN SIGNAL TRANSDUCTION	0.0228514
PROTEIN MODIFICATION	0.0241723
CELL ADHESION	0.0268229
PHOSPHATE METABOLISM	0.027262
RESPONSE TO PEST, PATHOGEN OR PARASITE	0.0315247
PROTEIN COMPLEX ASSEMBLY	0.0321835
MICROTUBULE-BASED PROCESS	0.0410114
CHEMOTAXIS	0.0475388
TAXIS	0.0475388
CELL COMMUNICATION	0.0481693
PHOSPHORYLATION	0.0492588

Inoltre, per quanto riguarda la categoria delle strutture citoscheletriche (il cui riarrangiamento è necessario per consentire la motilità cellulare), le sequenze che vengono attivate dal punto di vista trascrizionale dall'UTP sono quelle dei geni ACTB, CCDC6, KALPHA1, KIF1B e MYO1F. Al contrario, CXCL12 promuove preferenzialmente altri geni della stessa categoria, quali ANK1, TUBB, ARPC4 e AKAP13. Inoltre, il trattamento con UTP stimola trascrizionalmente molti geni correlati alla motilità cellulare: CRKL, PTPN12, PLXNC1, F11R, MAPK14 e RAP2A (80-83), nonché alcuni membri della famiglia delle Rho GTPasi

(ARHGEF2, ARHGEF7, ARHGEF9, ROCK1, ROCK2 e RAC2) (78, 79; 84-90). Al contrario, il trattamento con CXCL12 stimola preferenzialmente i geni CDC42, CDC42BPA, GRK6 (91) e IQGAP1 (92) (Figura 21), anche essi fortemente correlati ai processi di motilità e migrazione cellulare.



**Figura 21. Analisi del profilo**

**trascrizionale mediante *microarray*.** La

figura mostra i geni il cui profilo

trascrizionale è modulato in modo

significativo dal trattamento (per 24 ore) con

UTP, con CXCL12 o con entrambi i fattori. I

diversi geni sono raggruppati in base alla

categoria *Gene Ontology* di appartenenza. (A)

Organizzazione del citoscheletro e biogenesi.

(B) Motilità cellulare, Trasduzione del segnale

mediata da piccole GTPasi e Trasduzione del

segnale mediata da proteine Rho. (C)

Adesione cellulare



Per quanto riguarda i geni associati alla regolazione dei meccanismi di *homing*, è interessante notare come il trattamento con UTP da solo o con la combinazione UTP + CXCL12 stimoli in modo significativo la trascrizione dei geni GLG1 (93), RAC2, CD44 (94), CD164 (95) e SELPLG (96). In aggiunta, vengono attivati anche geni già noti per il ruolo che svolgono nella migrazione ed extravasazione dei leucociti, come ADAM8, ADAM28 (97), FUT7 (98) e CCM1 (99) (figura 5C; Tabella 2S).

La stimolazione con CXCL12, come atteso in base ai dati già descritti in letteratura, incrementa la trascrizione di geni la cui funzione è strettamente correlata ai processi di *homing* ed attecchimento midollare; tra questi, spiccano IFITM1 (100), IL7R (101) e SS18 (102).

Nel complesso, questi dati forniscono la chiave di interpretazione biomolecolare della capacità del nucleotide extracellulare UTP di incrementare la migrazione e l'*homing* midollare di cellule staminali CD34+.

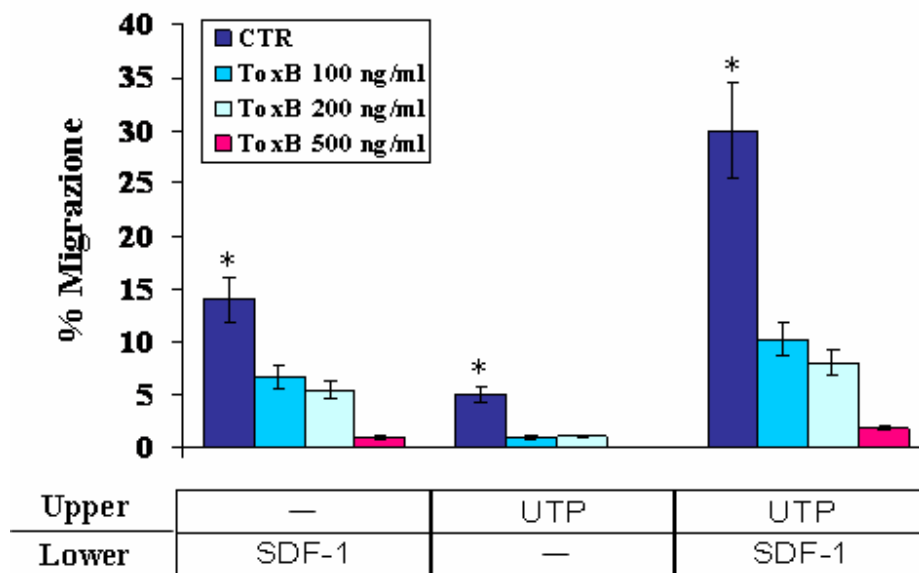
L'analisi dettagliata del profilo trascrizionale ha consentito inoltre di verificare l'effettiva condivisione, da parte dell'UTP e del CXCL12, di alcune vie di trasduzione del segnale. Ad esempio, entrambi i fattori sono in grado di reclutare membri della famiglia delle Rho GTPasi. Questi dati suggeriscono inoltre la capacità di UTP e di CXCL12 di interagire sinergicamente, attivando diverse vie di trasduzione coinvolte nel controllo della motilità e della migrazione cellulare.

## **8. La cascata di trasduzione del segnale delle Rho GTPasi.**

Alla luce dell'importante ruolo svolto dalle Rho GTPasi nella modulazione di fenomeni migratori, abbiamo ritenuto interessante indagare con maggior dettaglio il ruolo svolto da questa famiglia di proteine nella migrazione mediata da UTP.

Come sottolineato nel paragrafo precedente, dalle analisi trascrizionali di *microarray* è emersa una significativa attivazione di geni della famiglia delle RhoGTPasi in seguito a trattamento con UTP, sia da solo che combinato con CXCL12.

Questa osservazione ha rappresentato il punto di partenza di una serie di esperimenti volti alla validazione funzionale del ruolo delle Rho GTPasi nei fenomeni stimolati dall'UTP. A questo scopo, progenitori emopoietici CD34<sup>+</sup> sono stati trattati con la Tossina B (ToxB) di *Clostridium Difficile*, una molecola di 270 kDa nota per la sua capacità di inibire specificatamente le proteine della famiglia Rho, quali Rac, Rho e Cdc42. Sono stati quindi allestiti saggi di migrazione per studiare se, ed in quale misura, la Tossina B influenza la migrazione in presenza di UTP e/o di CXCL12.



**Figura 22. Saggio di inibizione con Tossina B di *C. Difficile*.** Le cellule CD34<sup>+</sup> sono state incubate per 18 ore in presenza di diverse concentrazioni di Tossina B (100, 200 e 500 ng/mL) e successivamente testate in saggi di migrazione. Il trattamento con ToxB, con un tipico andamento dose-risposta, ha diminuito sensibilmente la migrazione di cellule CD34<sup>+</sup> trattate con UTP, con CXCL12 o con entrambi i fattori.

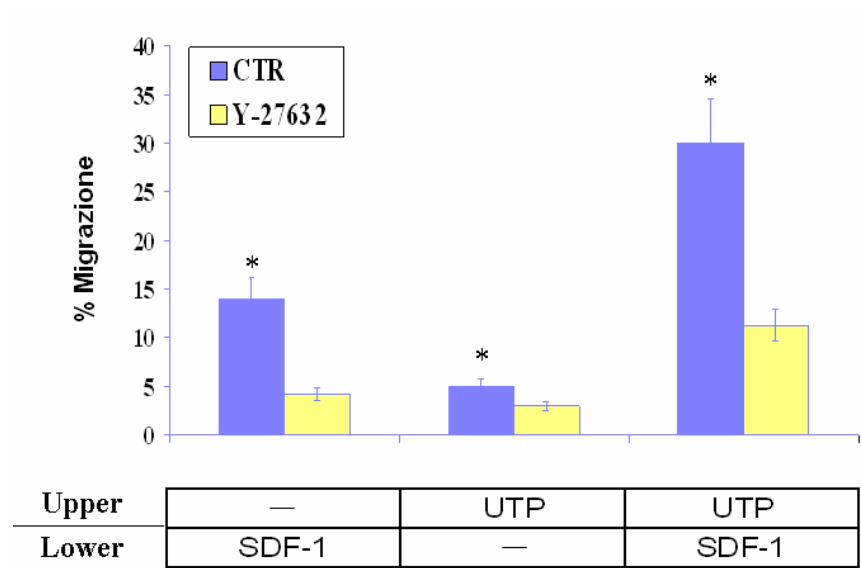
Come riassunto nella Figura 22, già in condizioni basali il pretrattamento con Tossina B diminuisce sensibilmente la capacità di cellule CD34<sup>+</sup> di migrare verso un gradiente di CXCL12, secondo una precisa curva dose-risposta. L'inibizione massima (>90%) è stata ottenuta al dosaggio di 500 ng/mL. Analogamente, anche la migrazione spontanea o verso CXCL12 di cellule trattate con UTP subisce un decremento significativo in seguito a trattamento con la tossina di *C. Difficile*. In particolare, la migrazione verso CXCL12 è diminuita più del 90% ( $p=0.02$ ), suggerendo l'effettivo ruolo delle Rho GTPasi nella via di trasduzione del segnale dipendente sia dal CXCL12, che dall'UTP.

Al fine di chiarire ulteriori dettagli della cascata trasduzionale del segnale attivata da recettori P2Y, sono stati inoltre eseguiti esperimenti di migrazione in presenza della molecola Y27632. Y27632 è un inibitore specifico della cinasi ROCK, la quale, oltre a rappresentare un effettore chiave della cascata delle Rho GTPasi, è anche uno dei geni emersi dall'analisi trascrizionale di cellule trattate con UTP.

In presenza dell'inibitore Y27632, la migrazione di cellule CD34<sup>+</sup> verso la chemochina CXCL12 subisce un decremento del 70% ( $p<0,05$ , come indicato in figura 6B). Analogamente, anche la migrazione spontanea di cellule trattate con UTP, così come la loro responsività a CXCL12 è risultata diminuita in modo significativo (rispettivamente del 40% e del 62%;  $p<0,05$ ) dopo trattamento con Y27632 (Figura 23).

Parallelamente a questi saggi di inibizione sono stati eseguite analisi della vitalità cellulare. Il test di esclusione con Trypan Blue ha costantemente riportato percentuali di vitalità superiori al 90% in tutte le condizioni in studio (dati non mostrati), dimostrando che il diminuito tasso di migrazione è effettivamente imputabile ad un'attività inibitoria specifica e non ad effetti tossici secondari alla Tossina B o alla molecola Y27632.

Nel complesso, questi risultati dimostrano il coinvolgimento delle Rho GTPasi e dell'effettore ROCK nella migrazione verso gradienti di CXCL12 in cellule CD34<sup>+</sup> stimulate con UTP.



**Figura 23. Test di inibizione della cinasi ROCK con Y27632.** L'inibitore (ROCK-specifico) Y27632, incluso nel pozzetto superiore dei saggi di migrazione, ha prodotto una diminuzione statisticamente significativa della migrazione spontanea di cellule CD34<sup>+</sup> trattate con UTP, con CXCL12 o con entrambi i fattori contemporaneamente.

---

## DISCUSSIONE

---

Il panorama scientifico degli ultimi dieci anni ha visto crescere notevolmente, in ambito emopoietico, l'interesse per i meccanismi che regolano il traffico delle cellule staminali dal, e verso, il microambiente midollare.

Nonostante alcuni fattori chemiotattici (come il CXCL12) ed interazioni chiave (ad esempio VLA-4/VCAM-1) alla base di questo fenomeno siano stati delucidati, rimane ancora molto da chiarire sui processi di *homing* e mobilizzazione; plausibilmente, i fattori di crescita, le chemochine o le molecole di adesione che vi giocano un ruolo sono molti di più rispetto a quelli finora identificati.

La famiglia dei nucleotidi extracellulari, in particolare, sta emergendo in modo sempre più evidente come mediatrice di molteplici funzioni biologiche, tra le quali proliferazione e differenziamento, apoptosi, necrosi, secrezione di citochine e chemochine, nonché fenomeni

chemiotattici. E' stato infatti dimostrato che nucleotidi sia purinici che pirimidinici sono in grado di promuovere la migrazione di numerosi istotipi cellulari, tra i quali anche molte cellule emopoietiche, come eosinofili, monociti, neutrofilo e cellule dendritiche. Significativo è, inoltre, il risultato di un recente studio, nel quale il recettore P2Y<sub>14</sub> (o GPR105) è emerso come *marker* putativo di una popolazione midollare estremamente quiescente. In base all'ipotesi formulata dagli autori, questo recettore potrebbe essere coinvolto nell'attrazione di cellule staminali verso specifiche nicchie midollari (103).

Partendo da tali presupposti, ci siamo pertanto chiesti se i nucleotidi extracellulari, attraverso l'attivazione dei recettori P2, potessero svolgere un'azione chemiotattica anche sul compartimento di cellule staminali emopoietiche.

Nello studio che ha preceduto la presente ricerca è stato dimostrato che cellule staminali umane CD34<sup>+</sup> esprimono recettori per nucleotidi extracellulari, sia della famiglia P2Y (P2Y<sub>1</sub> e P2Y<sub>2</sub>), che P2X (P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>, P2X<sub>6</sub>, P2X<sub>7</sub>). Attraverso saggi funzionali *in vitro* è stato inoltre dimostrato che il legame di questi recettori da parte dei nucleotidi ATP e, soprattutto, UTP induce un incremento del potenziale proliferativo di cellule staminali sia CD34<sup>+</sup>, che CD34<sup>-</sup> Lin<sup>-</sup>, nonché l'espansione dei progenitori emopoietici più immaturi LTC-IC (*long-term culture initiating cells*). Infine, mediante trapianto xenogenico di cellule CD34<sup>+</sup> umane in topi NOD/SCID, è emerso che la stimolazione (anche per brevi intervalli di tempo) con UTP è in grado di incrementare la componente SRC (SCID Repopulating Cells), vale a dire la frazione staminali in grado di attecchire nel midollo murino e di ricostituire l'emopoiesi (55).

Tale incremento della frazione SRC può essere l'espressione di diversi fenomeni; l'ipotesi su cui si basa il presente studio è che l'incubazione con UTP possa modulare positivamente il potenziale di attecchimento delle cellule CD34<sup>+</sup>, incrementandone la migrazione e l'*homing* midollare.

Per verificare questa ipotesi sono stati condotti, in primo luogo, saggi di migrazione *in vitro*, dai quali è emersa la capacità del nucleotide UTP di potenziare la migrazione indotta dalla chemochina CXCL12 in cellule staminali CD34<sup>+</sup>. Parallelamente, gli studi allestiti *in vivo* hanno evidenziato che l'*homing* midollare di cellule CD34<sup>+</sup> viene sensibilmente incrementato dal trattamento pre-reinfusione con UTP. Inoltre, è interessante notare che sia i saggi *in vitro*

che quelli *in vivo* concorrono a dimostrare che l'esposizione a questo nucleotide, anche per brevi intervalli di tempo, è sufficiente per promuovere la motilità e la capacità di *homing* dei progenitori emopoietici. Questo dato è particolarmente interessante se si considera che l'emivita dei nucleotidi in ambiente extracellulare è, a causa dell'azione degradativa delle endonucleotidasi, molto breve. Nell'insieme, quanto emerge dai saggi di migrazione *in vitro* ed *in vivo* è che il nucleotide UTP esercita un effetto di *priming* sui progenitori emopoietici umani, potenziandone la risposta alla chemotassina CXCL12.

Tale azione potrebbe dipendere dalla capacità dell'UTP di modulare i livelli di espressione o di attività del recettore per il CXCL12, CXCR4. In prima battuta sono stati quindi analizzati i livelli di espressione in membrana del recettore CXCR4 in una popolazione basale CD34<sup>+</sup>, stimolata con UTP per diversi intervalli di tempo; da questa analisi non è tuttavia emersa alcuna differenza significativa dei campioni trattati rispetto al controllo. Tuttavia, le analisi citofluorimetriche condotte separatamente su cellule migranti e non migranti (ottenute dai saggi di migrazione *in vitro*) suggeriscono che l'UTP possa influenzare le dinamiche farmacologiche del CXCR4, inibendone l'internalizzazione dopo legame con CXCL12. Inoltre, saggi di migrazione con il sistema *transwell*, hanno mostrato che l'inibizione dell'asse CXCL12/CXCR4 con anticorpi monoclonali anti-CXCR4 è in grado di bloccare anche l'effetto di promozione UTP-dipendente. Questo suggerisce, anche se con meccanismi non ancora elucidati, che l'effetto di *priming* dell'UTP si espliciti attraverso un potenziamento della cascata di trasduzione del segnale dipendente da CXCL12 e CXCR4.

Un altro aspetto di primaria importanza nel favorire l'*homing* midollare di cellule staminali emopoietiche, riguarda la modulazione delle interazioni di adesione con il microambiente circostante, come suggerito dal modello di Peled e collaboratori. Sorge pertanto spontaneo chiedersi se, tra i possibili meccanismi d'azione dei nucleotidi extracellulari, non vi sia anche la capacità di modulare la capacità di adesione di cellule staminali CD34<sup>+</sup> ai substrati dell'intorno midollare.

Analisi citofluorimetriche condotte su cellule trattate con UTP non hanno mostrato alcun cambiamento sostanziale, rispetto ai controlli non trattati, nei livelli di espressione in membrana delle integrine CD49d e CD49e, i principali recettori per la Fibronectina presente nella matrice extracellulare.

Tuttavia, ciò non esclude che l'UTP possa influenzare le capacità adesive delle cellule staminali modulando l'attività funzionale di questi recettori, piuttosto che il numero assoluto. Infatti, testando la capacità di queste cellule di aderire a piastre di coltura coattate con Fibronectina, abbiamo dimostrato che, almeno *in vitro*, l'UTP è in grado di incrementare in modo statisticamente significativo le proprietà adesive di cellule staminali emopoietiche umane. Simili risultati sono recentemente emersi dallo studio anche di altre molecole coinvolte nella migrazione di cellule staminali (come l'agente immunosoppressivo FTY720), il quale sinergizza l'azione del CXCL12, senza tuttavia influenzare il livello di espressione delle integrine. E' inoltre interessante notare che le analisi di *microarray* condotte in questo studio hanno evidenziato dopo trattamento con UTP un significativo aumento nei livelli di trascrizione di geni associati a funzioni di adesione cellulare e noti come regolatori positivi dell'*homing* emopoietico. Tra questi geni emergono, in particolare, GLG1, RAC2, CD44, CD164 e SELPLG.

Tanto il CXCR4, quanto i recettori della famiglia P2Y appartengono al gruppo dei recettori a sette eliche transmembrana, associati a proteine G. Questa struttura recettoriale è caratteristica di numerosi recettori chemochinici, che condividono, oltre che un'analogia strutturale terziaria, anche simili cascate trasduzionali del segnale, che culminano nell'attivazione di risposte chemiotattiche. In particolare, diversi recettori accoppiati a proteine G trimeriche e i loro rispettivi ligandi, noti per il ruolo svolto nell'allestimento di risposte flogistiche ed immunitarie, sono recentemente emersi come mediatori chiave anche della migrazione e dell'*homing* di cellule staminali emopoietiche. Analogamente, il nostro studio indica che anche i nucleotidi extracellulari, già noti per essere coinvolti in processi infiammatori, potrebbero modulare fisiologicamente la migrazione di cellule staminali da, e verso, il midollo osseo.

Come riscontrato per altri recettori associati a proteine G trimeriche, anche la chemiotassi indotta da UTP può essere bloccata mediante la tossina derivata da *Burdetella Pertussis*. I saggi di inibizione condotti con tale tossina hanno mostrato che tanto la cascata trasduzionale del segnale dipendente da CXCL12, quanto quella attivata dai nucleotidi extracellulari richiedono il reclutamento funzionale di proteine G. Pertanto, le cellule staminali emopoietiche sembrano seguire dinamiche molecolari e funzionali simili a quelle già descritte in cellule terminalmente differenziate per migrare dal circolo periferico a siti extravascolari (come quelle osservate in



leucociti attivati da stimoli flogistici). Inoltre, la capacità della tossina della Pertosse di inibire l'*homing* midollare e l'attecchimento a breve termine, bloccando un'ampia gamma di cascate del segnale, suggerisce che diverse molecole partecipino in modo cooperativo alla trasduzione di segnali di *homing*, che finiscono col convergere in vie dipendenti da proteine G (104-107). Anche il presente studio sembra indicare nelle proteine G un plausibile punto di incontro nelle vie di trasduzione di CXCL12 ed UTP, che agiscono in modo cooperativo nel modulare la migrazione di cellule staminali emopoietiche.

Inoltre, cellule staminali trattate con UTP mostrano un incremento significativo del tasso trascrizionale di numerosi geni coinvolti nella regolazione della motilità e delle strutture cellulari, coinvolte in processi di migrazione. In particolare, le proteine RhoGTPasi sono state recentemente descritte in diversi ambiti come mediatori primari di fenomeni chemotattici, in grado di influenzare la motilità e la polarità delle cellule, nonché i riarrangiamenti citoscheletrici e la polimerizzazione dei filamenti di actina. Membri della famiglia delle RhoGTPasi sono in particolare emersi come mediatori chiave della via di trasduzione del segnale attivata dall'interazione tra CXCL12 e CXCR4. Analogamente, il recettore per la sfingosina-1-fosfato (appartenente ad una nuova classe di recettori associati a proteine G), è stato recentemente dimostrato essere in grado di sinergizzare con l'asse CXCL12/CXCR4 proprio attraverso il reclutamento delle RhoGTPasi.

Per quanto riguarda i nucleotidi extracellulari, il trattamento con UTP è in grado di incrementare, in cellule staminali emopoietiche umane, il livello trascrizionale di geni codificanti per membri della famiglia delle RhoGTPasi (Rac2), così come di geni codificanti per proteine regolatorie di questa via (ARHGEF2, ARHGEF7 e ARHGEF9) o di effettori a valle (ROCK1 e ROCK2), mentre CXCL12 sembra in grado di aumentare preferenzialmente altri membri della stessa famiglia (quali CDC42 e CDC42BPA). Pertanto, l'attivazione combinata mediante UTP e CXCL12 produce il reclutamento simultaneo di diversi membri della stessa famiglia, inducendo presumibilmente un'attivazione sinergica di questa via di trasduzione del segnale chemotattico e, dal punto di vista funzionale, una complementarietà reciproca dei due recettori.

Inoltre, saggi *in vitro* di inibizione di tale via del segnale, eseguiti in presenza della Tossina B di *Clostridium Difficile* e dell'inibitore Y27632, conferma ulteriormente il ruolo chiave svolto dalle

proteine RhoGTPasi nella migrazione verso un gradiente di CXCL12 di cellule staminali stimulate con UTP.

Dal presente studio emerge pertanto che, così come la via di trasduzione dipendente dal CXCL12, anche la cascata del segnale attivata dai nucleotidi extracellulari richiede il reclutamento di membri della famiglia delle RhoGTPasi e di effettori ad essa correlati, la cui azione concertata produce l'attivazione di comportamenti migratori. Da questo emerge che l'attivazione di analoghe vie di segnalazione intracellulare, mediata dai nucleotidi extracellulari, potrebbe contribuire al potenziamento della risposta dipendente dal CXCL12.

Tali osservazioni sono in linea con quanto recentemente emerso nel campo della biologia della migrazione cellulare (108). E' stato infatti dimostrato che numerose molecole di natura non-peptidica, come i leucotrieni ed altri mediatori lipidici, per citare solo gli esempi più rilevanti, sono coinvolti sia nell'allestimento di risposte flogistiche che nel reclutamento di cellule staminali emopoietiche verso la nicchia midollare. Come recentemente sottolineato da diversi studi nel campo, entrambi questi fenomeni, infiammazione ed *homing* di cellule staminali, si verificano simultaneamente *in vivo* nel microambiente midollare dopo esposizione a farmaci o agenti con effetti tossici sul DNA (108). Tra gli altri, il gruppo di Ponomaryov (109) ha in particolare messo in luce come la capacità di cellule staminali umane di migrare verso il midollo osseo di topi NOD/SCID risulta significativamente aumentata quando le cellule vengono trapiantate nell'animale 24-48 ore dopo il trattamento con mio-/radio-terapici. In questa finestra temporale si raggiunge infatti il picco di secrezione di fattori che, come il CXCL12, sono in grado di promuovere la migrazione e la sopravvivenza cellulare. Come diretta conseguenza di tale fenomeno, l'aumentata secrezione di CXCL12 è in grado di aumentare l'*homing* e la sopravvivenza delle cellule staminali emopoietiche trapiantate. Per questo motivo, l'incremento di CXCL12 può essere visto come parte integrante del complesso insieme di risposte biologiche che, durante situazioni di pericolo e di danno tissutale, viene innescato come sistema di difesa per controbilanciare gli effetti indotti da trattamenti chemio-/radio-terapici e della conseguente morte cellulare.

Analogamente a quanto visto per il CXCL12, anche i nucleotidi extracellulari vengono rilasciati da linfociti attivati, macrofagi e piastrine, così come da cellule necrotiche ed apoptotiche, e la loro concentrazione aumenta sensibilmente *in vivo* in situazioni di pericolo

per l'organismo o di danno cellulare (110). I nucleotidi rilasciati agiscono poi come segnalatori stessi del pericolo e partecipano attivamente all'attivazione delle risposte flogistiche. Tali osservazioni, insieme alla già dimostrata capacità dell'UTP di espandere cellule staminali emopoietiche umane e alla presente prova della sua abilità di incrementarne anche l'*homing* midollare, supportano l'ipotesi che i nucleotidi extracellulari rilasciati durante situazioni di pericolo e/o danno cellulare possano attivare di vie di segnalazione paracrina o autocrina (parallelamente ad altre vie attivate da chemochine quali CXCL12), per il reclutamento e la stimolazione di cellule staminali emopoietiche (111, 112).

L'ipotesi che si fa strada è quindi quella che vede i nucleotidi extracellulari come una delle forme evolutivamente più antiche di comunicazione inter-cellulare, in grado di agire come mediatori universali di situazioni di pericolo. Anche dal punto di vista biochimico, i nucleotidi sono tra le forme molecolari più ancestrali, in grado di assolvere, già negli organismi unicellulari, molteplici funzioni: prima fra tutte, la sintesi degli acidi nucleici, sulla cui replicazione poggiano i meccanismi di propagazione del patrimonio genetico e, in senso lato, di riproduzione. In secondo luogo, i nucleotidi svolgono una fondamentale funzione "nutritiva", grazie alla presenza di gruppi fosfato, preziose fonti di energia per le attività metaboliche cellulari.

Non stupisce, pertanto, che i nucleotidi extracellulari possano essere stati evolutivamente reclutati anche come meccanismo di comunicazione tra primitivi organismi unicellulari.

Sebbene lo studio della biologia dei nucleotidi extracellulari si sia svolto finora quasi esclusivamente in organismi superiori, esistono dati interessanti relativamente al rilascio di queste molecole nell'ambiente extracellulare da parte di lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*), batteri (sia Gram-positivi, che Gram-negativi) (113) e tessuti vegetali (come osservato in *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris* e *Nicotina tabacum*) (114). Di rilievo è il fatto che, in tutti questi casi, il rilascio di nucleotidi avviene da parte di cellule e tessuti intatti (e non, quindi, aspecificatamente come fenomeno secondario a lisi cellulare), suggerendo l'esistenza di trasportatori di membrana per quelli che, anche nel modo degli organismi unicellulari o comunque più primitivi, potrebbero essere molecole chiave di comunicazione extracellulare. L'esempio forse più rilevante (115), anche per il risvolto clinico che potrebbe avere, è dato dal lievito *Candida albicans*, che si è scoperto esprimere una forma ancestrale del recettore P2X<sub>7</sub>.

L'attivazione di questo recettore da parte di ATP extracellulare è in grado di attivare circuiti citotossici che determinano, infine, la morte del fungo patogeno.

Anche con l'evoluzione degli organismi pluricellulari, queste funzioni dei nucleotidi sono state mantenute e progressivamente integrate da sistemi molecolarmente più complessi, in modo consensuale allo sviluppo di organismi evolutivamente più avanzati.

Sorge spontaneo chiedersi, per quale motivo molecole così semplici come i nucleotidi extracellulari, o i leucotrieni, continuino ad essere positivamente selezionate dai processi evolutivi, nonostante lo sviluppo e la disponibilità di sistemi di comunicazione più specifici e raffinati.

La risposta potrebbe risiedere nella natura non-peptidica di queste molecole, la quale, seppure a spese di una maggiore specificità, garantirebbe: i) la comunicazione tra organismi diversi, senza che questo scateni risposte immunitarie; ii) la rapida generazione ed attivazione di meccanismi di difesa (all'interno dello stesso organismo), in risposta a situazioni di pericolo, di stress metabolico o di danno tissutale, anche in assenza di uno stimolo antigenico.

i. Comunicazione tra specie ed organismi diversi.

Esiste una branca dell'ecologia denominata *allelochimica*, incentrata sullo studio di quelle sostanze chimiche (allelomoni), che vengono rilasciate da un organismo per influenzare la fisiologia, il metabolismo o il comportamento di organismi di una specie diversa (116). Questo affascinante meccanismo di comunicazione inter-specie è stato ampiamente descritto nei procarioti, nelle piante e in molti invertebrati. Sono tuttavia emersi recentemente numerosi dati a favore dell'ipotesi che la comunicazione allelochimica giochi un ruolo importante anche nei vertebrati. Senza voler eludere quello che è l'argomento di questa tesi, ritengo interessante quanto meno accennare al fatto che, in quanto molecole primordiali condivise da tutti gli organismi viventi noti, i nucleotidi extracellulari potrebbero rappresentare un'importante, seppure ancora inesplorata, classe di molecole allelochimiche per la comunicazione tra organismi di specie diverse. Questo potrebbe aprire la via ad un'interessante revisione dei meccanismi molecolari che sottendono, ad esempio, la relazione che si instaura nell'organismo umano tra la flora batterica e il tubo digerente, le prime vie respiratorie o le mucose genitali.

L'attivazione di recettori P2, espressi sia dalle cellule umane che batteriche, rappresenta forse uno dei meccanismi alla base del linguaggio molecolare che consentirebbe la comunicazione tra questi due regni evolutivamente così distanti?

ii. Attivazione di meccanismi di difesa: risposta a stress metabolici e danni tissutali.

Un numero sempre crescente di studi ha contribuito a puntualizzare il ruolo dei nucleotidi extracellulari come segnali di pericolo e mediatori dell'immunità innata, rilasciati sia in seguito ad aggressioni *esterne* (di natura chimica o microbica), che *interne* (come nel caso di processi infiammatori parossistici). A seconda dello stimolo che induce il rilascio di nucleotidi, questi possono infatti agire come promotori delle risposte immunitarie e flogistiche, oppure come molecole in grado di smorzare l'iper-attivazione dei sistemi di difesa, prima che questi danneggino l'organismo stesso che li produce.

Diversi nucleotidi (sia ATP, che UTP), agendo su recettori diversi (P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2X<sub>7</sub>) e su tipi cellulari diversi, possono stimolare risposte flogistiche, attraverso l'induzione di molecole di adesione e secrezione di chemochine e citochine. L'attività *pro-infiammatoria* dei nucleotidi extracellulari rappresenta, tuttavia, solo una faccia della medaglia; è stato infatti dimostrato che ATP ed UTP possono agire anche come molecole *anti-infiammatorie*, inibendo la secrezione di citochine e chemochine infiammatorie da parte di monociti, macrofagi e cellule dendritiche. I fattori che determinerebbero in quale direzione penderà l'ago della bilancia immunitaria, sarebbero funzione della concentrazione dei nucleotidi in un certo *milieu*, degli isotipi cellulari che vengono reclutati in quel sito e del tipo di recettori P2 espressi da queste cellule.

Sebbene l'attività difensiva mediata dai nucleotidi sia stata studiata prevalentemente nell'ambito di cellule immunitarie, il presente studio dimostra che anche il compartimento staminale emopoietico può essere influenzato da queste molecole.

La possibilità che queste cellule possano essere influenzate da molecole infiammatorie come i nucleotidi extracellulari assume, tra l'altro, un significato del tutto peculiare nel fenomeno delle cellule staminali circolanti nel sangue periferico. Ormai da anni è infatti noto che, seppure in basse percentuali, esistono nell'individuo adulto cellule staminali, che ricircolano

continuamente al di fuori dell'ambiente midollare; quale sia il significato biologico di tale fenomeno è, tuttavia, ancora oggetto di dibattito.

E' stato ipotizzato che la capacità di ricircolo di tali cellule non sia altro che un residuo dell'intensa attività migratoria che, durante le diverse fasi di sviluppo embrio-fetale, consente alle cellule staminali emopoietiche di raggiungere e colonizzare i diversi organi sede di emopoiesi, dal sacco vitellino al midollo osseo.

Nel corso degli ultimi anni si è tuttavia fatta strada l'ipotesi che questa popolazione di cellule staminali circolanti, più che un semplice "ricordo", possa rappresentare un investimento dell'organismo in sviluppo per la propria vita di individuo adulto. E' stato infatti dimostrato che chemiotassine e molecole infiammatorie partecipano nel ricircolo e nel traffico migratorio di cellule staminali emopoietiche, non solo a livello midollare, ma anche verso altri tessuti. Inoltre, è emerso che il fattore chemiotattico CXCL12 non è secreto solo a livello midollare, ma anche in molti altri organi e tessuti (come cuore, rene, muscolo scheletrico e tessuto neuronale), dove si ritiene che possa giocare un ruolo chiave nel reclutamento di cellule staminali con potenziale rigenerativo. Un tale sistema riparativo/rigenerativo, come quello osservato in certi organismi primitivi, potrebbe quindi continuare ad esistere anche negli organismi superiori e potrebbe avere un ruolo biologicamente significativo nella riparazione di danni tissutali di piccola entità (e, quindi, clinicamente silenti), contribuendo in tal modo al mantenimento dell'omeostasi del sistema.

Alla luce di queste considerazioni, è nostra opinione che i nucleotidi extracellulari possano agire, non solo come segnali di pericolo, ma agendo su compartimenti come quello staminali emopoietico, anche come promotori dell'omeostasi dell'organismo in generale.

Secondo il modello da noi teorizzato, segnali di pericolo (come radiazioni, infezioni o insulti chimici) contribuirebbero al rilascio di nucleotidi extracellulari, i quali, attraverso l'attivazione dei recettori P2, attiverrebbero il compartimento ematopoietico (Figura 24). Le cellule staminali, nella veste di "*homeo-keeper cells*", potrebbero contribuire ad arginare questa situazione di pericolo, secondo due vie principali:

- i.) promuovendo la proliferazione ed espansione del compartimento di progenitori commissionati (CFU-GM), con conseguente aumentata produzione di cellule

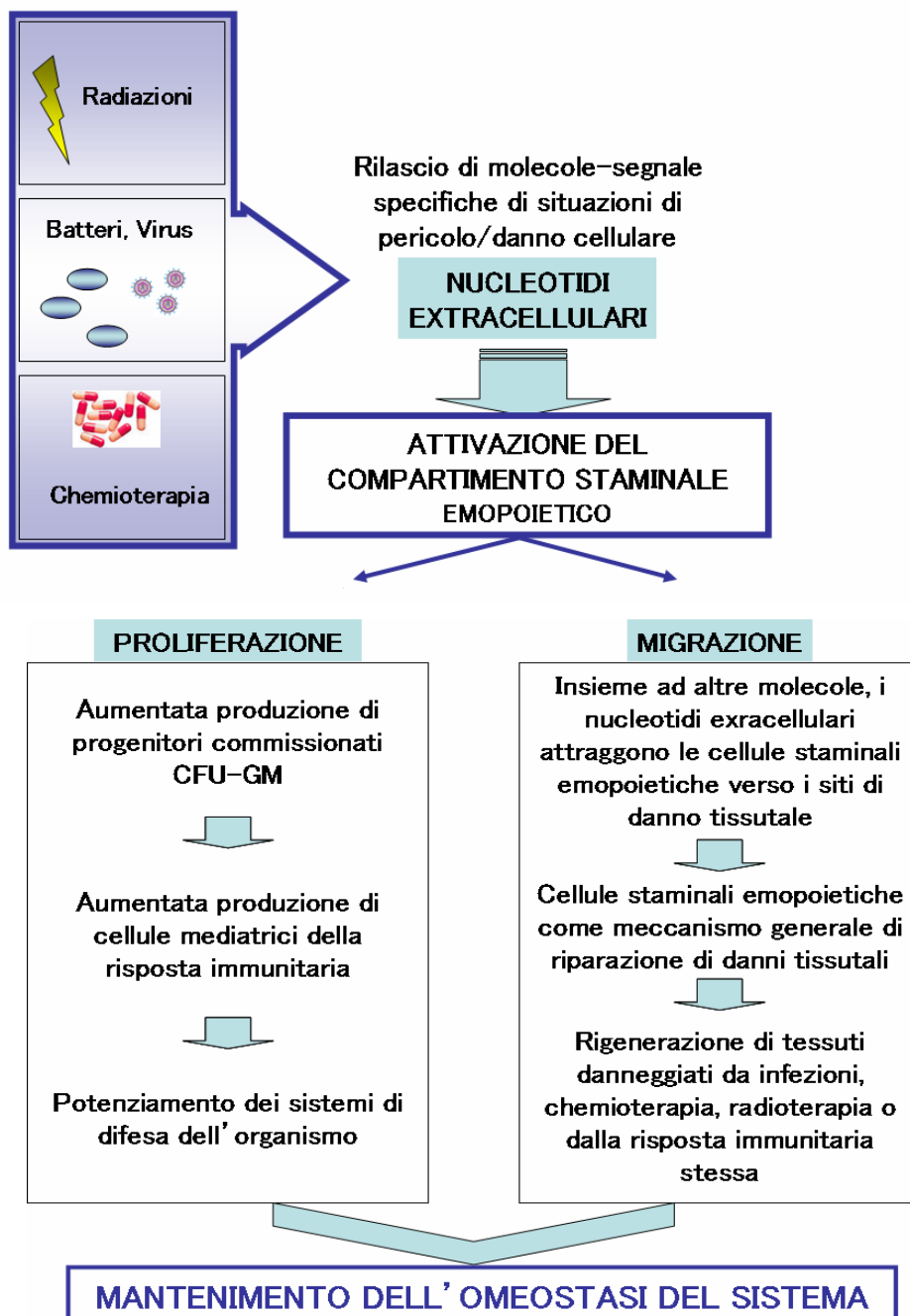
mature, mediatrici di risposte flogistiche ed immunitarie, e potenziamento dei sistemi di difesa dell'organismo (55);

- ii.) attivando, in concerto con altre chemiotossine (come il CXCL12), la migrazione di cellule staminali emopoietiche, indirizzandole verso siti di danno tissutale, dove potrebbero partecipare a meccanismi di riparazione e rigenerazione tissutale.

L'integrazione di queste risposte contribuirebbe, infine, al mantenimento delle condizioni omeostatiche dell'organismo. Parallelamente, questa visione dei nucleotidi extracellulari come mediatori di risposte omeostatiche, contribuirebbe a spiegare anche l'azione bivalente che queste molecole hanno sul sistema immunitario, nell'ambito del quale agiscono sia come molecole pro-, che anti-infiammatorie.

Nell'insieme, il presente studio aggiunge un ulteriore tassello alla biologia dei nucleotidi extracellulari, suggerendo che queste molecole possano giocare un ruolo chiave nel *milieu* citochinico, coinvolto nella regolazione del traffico di cellule staminali in situazioni sia fisiologiche, che patologiche.

## NUCLEOTIDI EXTRACELLULARI E *HOMEO-KEEPER* CELLS



**Figura 24.** Schema riassuntivo dell'ipotetico ruolo dei nucleotidi extracellulari come modulatori delle funzioni di *homeo-keeper cells* delle cellule staminali emopoietiche.



---

## BIBLIOGRAFIA

---

1. Metcalf D. **The molecular control of cell division, differentiation, commitment and maturation in hematopoietic cells.** *Nature.* 1989; 339:27-30.
2. Tura S. **Lezioni di ematologia.** Ed. Esculapio.
3. Waller EK. **The hematopoietic microenvironment: heterogeneity of bone marrow stromal cells: growth properties and cytokines. Production by CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>-</sup> stromal sub-sets.** *Hematology* 1999; 4: 47-58.
4. Ogawa M. **Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells.** *Blood.* 1993; 81: 2844-2853.
5. Kirkland MA. **A phase space model of hemopoiesis and the concept of stem cell renewal.** *Exp Hematol.* 2004 Jun;32(6):511-9.

6. Muller-Sieburg CE, Cho RH, Thoman M, Adkins B, Sieburg HB. **Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation.** *Blood.* 2002 Aug 15;100(4):1302-9.
7. Quesenberry PJ, Colvin GA, Abedi M, Dooner G, Dooner M, Aliotta J, Keaney P, Luo L, Demers D, Peterson A, Foster B, Greer D. **The stem cell continuum.** *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1044:228-35. Review.
8. Weiss MJ, Orkin SH. **GATA transcription factor: key regulators of hematopoiesis.** *Exp. Hematol.* 1995; 23:99-107.
9. Carlo-Stella C, Cazzola M, De Fabritiis P et al. **34-positive cells: biology and clinical relevance.** *Haematologica.* 1995;80:367-87.
10. Krause DS, Fackler MJ et al. **CD34: structure, biology and clinical utility.** *Blood.* 1996; 87:1-13.
11. Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, et al. **Antigen CD34<sup>+</sup> marrow cells engraft lethally irradiated baboons.** *J Clin Invest.* 1988;81: 951-955.
12. Bensinger WI, Buckner CD, Shannon-Dorcy K, et al. **Transplantation of allogeneic CD34<sup>+</sup> peripheral blood stem cells in patients with advanced hematologic malignancy.** *Blood.* 1996;88: 4132-4138.
13. Dunbar CE, Cottler-Fox M, O'Shaughnessy JA, et al. **Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation.** *Blood.* 1995;85: 3048-3057.
14. Cheng J, Baumhueter S, Cacalano G, et al. **Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34.** *Blood.* 1996;87: 479-484.
15. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, et al. **Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species.** *Nat Med.* 1997;3: 1337-1344.
16. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. **Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell.** *Science.* 1996;273: 242-245.
17. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. **A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity.** *Nat Med.* 1998;9: 1038-1045.

18. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa, M. **Human bone marrow CD34<sup>+</sup> cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34<sup>+</sup> cells.** *Exp Hematol.* 1998;26: 353-360.
19. Sato T, Laver JH, Ogawa M. **Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells.** *Blood.* 1999;94: 2548-2554.
20. Dao MO, Arevalo J, Nolte J. **Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution.** *Blood.* 2003;101: 112-118.
21. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Zeng H, Ogawa M. **Reversible expression of CD34 by adult human bone marrow long-term engrafting hematopoietic stem cells.** *Exp Hematol.* 2003;31: 406-412.
22. McCulloch EA, Till JE, Siminovitch L. **Genetic factors affecting the control of hemopoiesis.** *Proc Can Cancer Conf.* 1966;6:336-56.
23. McCulloch EA, Siminovitch L, Till JE, Russell ES, Bernstein SE. **The cellular basis of the genetically determined hematopoietic defect in anemic mice of genotype Sl-Sld.** *Blood.* 1965;26(4):399-410.
24. Taylor EW. **Cell motility.** *J Cell Sci Suppl.* 1986;4:89-102.
25. Laurence AD. **Location, movement and survival: the role of chemokines in haematopoiesis and malignancy.** *Br J Haematol.* 2006 Feb;132(3):255-67.
26. Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, et al. **The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34<sup>+</sup> cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice.** *Blood.* 2000;95:3289-3296.
27. Lapidot T, Petit I. **Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells.** *Exp Hematol.* 2002;30:973-981.
28. Lapidot T, Kollet O. **The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice.** *Leukemia.* 2002;16:1992-2003.

29. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. **The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34<sup>+</sup> progenitors to peripheral blood.** *J Exp Med.* 1997;185:111-120.
30. Wright DE, Bowman EP, Wagers A, Butcher EC, Weissman IL. **Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines.** *J Exp Med.* 2002;195:1145-1154.
31. Jo DY, Rafii S, Hamada T, Moore MAS. **Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1.** *J Clin Invest.* 2000;105:101-111.
32. Kollet O, Spiegel A, Peled A, et al. **Rapid and efficient homing of human CD34(+)/CD38(-/low)/CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice.** *Blood.* 2001;97:3283-3291.
33. Peled A, Petit I, Kollet O, et al. **Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4.** *Science.* 1999;283:845-848.
34. Ma Q, Jones D, Springer TA. **The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment.** *Immunity.* 1999;10:463-471.
35. Rosu-Myles M, Gallacher L, Murdoch B, et al. **The human hematopoietic stem cell compartment is heterogeneous for CXCR4 expression.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:14626-14631.
36. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. **Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis.** *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):50-6.
37. Cancelas JA, Jansen M, Williams DA. **The role of chemokine activation of Rac GTPases in hematopoietic stem cell marrow homing, retention, and peripheral mobilization.** *Exp Hematol.* 2006 Aug;34(8):976-85.
38. Di Virgilio F, Chiozzi P, Ferrari D, et al. **Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells.** *Blood.* 2001;97: 587-600.
39. Boeynaems JM, Communi D, Gonzalez NS, Robaye B. **Overview of the P2 receptors.** *Semin Thromb Hemost.* 2005 Apr;31(2):139-49.

40. Ralevic V, Burnstock G. **Receptors for purines and pyrimidines.** *Pharmacol Rev.* 1998;50: 413-492.
41. North A, Surprenant AM. **Pharmacology of cloned P2X receptors.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40: 563-580.
42. Suh BC, Kim JS, Namgung U, Ha H, Kim KT. **P2X7 nucleotide receptor mediation of membrane pore formation and superoxide generation in human promyelocytes and neutrophils.** *J Immunol.* 2001;166: 6754-6763.
43. Sluyter R, Barden JA, Wiley JS. **Detection of P2X purinergic receptors on human B lymphocytes.** *Cell Tissue Res.* 2001;304: 231-236.
44. Di Virgilio F, Wiley JS. **The P2X<sub>7</sub> receptor of CLL lymphocytes—a molecule with a split personality.** *Lancet.* 2002;360: 1898-1899.
45. Von Kugelgen I, Wetter A. **Molecular pharmacology of P2Y-receptors.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000;62: 310-323.
46. von Kugelgen I. **Pharmacological profiles of cloned mammalian P2Y-receptor subtypes.** *Pharmacol Ther.* 2006 Jun;110(3):415-32. Epub 2005 Oct 28.
47. Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. **Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins.** *Cell Signal.* 2002 Feb;14(2):99-108.
48. Hechler B, Cattaneo M, Gachet C. **The P2 receptors in platelet function.** *Semin Thromb Hemost.* 2005 Apr;31(2):150-61.
49. White N, Burnstock G. **P2 receptors and cancer.** *Trends Pharmacol Sci.* 2006 Apr;27(4):211-7.
50. Gualtieri RJ, Berne RM, McGrath HE, Hunster WJ, Quesenberry PJ. **Effect of adenine nucleotides on granulopoiesis and lithium-induced granulocytosis in long-term bone marrow cultures.** *Exp Hematol.* 1986;14: 689-695.
51. Ferrari D, la Sala A, Panther E, Norgauer J, Di Virgilio F, Idzko M. **Activation of human eosinophils via P2 receptors: novel findings and future perspectives.** *J Leukoc Biol.* 2006 Jan;79(1):7-15. Epub 2005 Oct 21.
52. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F. **The P2X<sub>7</sub> receptor: a key player in IL-1 processing and release.** *J Immunol.* 2006 Apr 1;176(7):3877-83.

53. Ferrari D, La Sala A, Chiozzi P, et al. **The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release.** *FASEB J.* 2000;14: 2466-2476.
54. Sak K, Boeynaems JM, Everaus H. **Involvement of P2Y receptors in the differentiation of haematopoietic cells.** *J Leukoc Biol.* 2003;73: 442-447.
55. Lemoli RM, Ferrari D, Fogli M, et al. **Extracellular nucleotides are potent stimulators of human hematopoietic stem cells in vitro and in vivo.** *Blood.* 2004;104:1662-1670.
56. Dubyak GR, El-Moatassim C. **Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides.** *Am J Physiol.* 1993;265: 577-606.
57. Communi D, Janssens R, Suarez-Huerta N, Robaye B, Boeynaems JM. **Advances in signalling by extracellular nucleotides. the role and transduction mechanisms of P2Y receptors.** *Cell Signal.* 2000 Jun;12(6):351-60.
58. Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K. **Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor.** *Mol Pharmacol.* 1996 Aug;50(2):224-9.
59. Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. **P2 receptors: intracellular signaling.** *Pflugers Arch.* 2006 Aug;452(5):552-62.
60. Wang M, Kong Q, Gonzalez FA, Sun G, Erb L, Seye C, Weisman GA. **P2Y nucleotide receptor interaction with alpha integrin mediates astrocyte migration.** *J Neurochem.* 2005 Nov;95(3):630-40.
61. Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, et al. **Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors.** *J Neurosci.* 2001;21: 1975-1982.
62. McCloskey MA, Fan Y, Luther S. **1 Chemotaxis of rat mast cells toward adenine nucleotides.** *J Immunol.* 1999;163: 970-977.
63. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel PA, Junger WG. **ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors.** *Science.* 2006 Dec 15;314(5806):1792-5.

64. Bagchi S, Liao Z, Gonzalez FA, Chorna NE, Seye CI, Weisman GA, Erb L. **The P2Y2 nucleotide receptor interacts with alphav integrins to activate Go and induce cell migration.** *J Biol Chem.* 2005 Nov 25;280(47):39050-7.
65. Verghese MW, Kneisler TB, Boucheron JA. **P2U agonists induce chemotaxis and actin polymerization in human neutrophils and differentiated HL60 cells.** *J Biol Chem.* 1996 Jun 28;271(26):15597-601.
66. Idzko M, Dichmann S, Ferrari D, et al. **Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors.** *Blood.* 2002;100: 925-932.
67. Schnurr M, Toy T, Stoitzner P, et al. **ATP gradients inhibit the migratory capacity of specific human dendritic cell types: implications for P2Y11 receptor signaling.** *Blood.* 2003;102: 613-620.
68. Kaufmann A, Musset B, Limberg SH, Renigunta V, Sus R, Dalpke AH, Heeg KM, Robaye B, Hanley PJ. **"Host tissue damage" signal ATP promotes non-directional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes.** *J Biol Chem.* 2005 Sep 16;280(37):32459-67.
69. Klepeis VE, Weinger I, Kaczmarek E, Trinkaus-Randall V. **P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration.** *J Cell Biochem.* 2004 Dec 15;93(6):1115-33.
70. Pillois X, Chaulet H, Belloc I, Dupuch F, Desgranges C, Gadeau AP. **Nucleotide receptors involved in UTP-induced rat arterial smooth muscle cell migration.** *Circ Res.* 2002 Apr 5;90(6):678-81.
71. Chaulet H, Desgranges C, Renault MA, et al. **Extracellular nucleotides induce arterial smooth muscle cell migration via osteopontin.** *Cir Res.* 2001;89:772-778.
72. Kim CH, Broxmeyer HE. **In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment.** *Blood.* 1998;91:100-110.
73. Christopherson KW, Cooper S, Broxmeyer HE. **Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells.** *Blood.* 2003;101:4680-4686.

74. Whetton AD, Lu Y, Pierce A, Carney L, Spooncer E. **Lysophospholipids synergistically promote primitive hematopoietic cell chemotaxis via a mechanism involving Vav1.** *Blood.* 2003;102:2798-2802.
75. Voermans C, Anthony EC, Mul E, van der Schoot E, Hordijk P. **SDF-1 induce actin polymerization and migration in human hematopoietic progenitor cells.** *Exp. Hematol.* 2001;29:1456-1464.
76. Huygen S, Giet O, Artisien V, Di Stefano I, Beguin Y, Gothot A. **Adhesion of synchronized human hematopoietic progenitor cells to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1 fluctuates reversibly during cell cycle transit in ex vivo culture.** *Blood.* 2002;100:2744-2752.
77. Manfredini R, Zini R, Salati S, et al. **The kinetic status of hematopoietic stem cell subpopulations underlies a differential expression of genes involved in self-renewal, commitment, and engraftment.** *Stem Cells.* 2005;23:496-506.
78. Nishihara H, Maeda M, Oda A, et al. **DOCK2 associates with CrkL and regulates Rac1 in human leukemia cell lines.** *Blood.* 2002;100:3968-3974.
79. Sastry SK, Lyons PD, Schaller MD, Burridge K. **PTP-PEST controls motility through regulation of Rac1.** *J Cell Sci.* 2002; 115 :4305-4316.
80. Walzer T, Galibert L, De Smedt T. **Dendritic cell function in mice lacking Plexin C1.** *Int Immunol.* 2005; 17: 943-950.
81. Ostermann G, Weber KS, Zerneck A, Schroder A, Weber C. **JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes.** *Nat Immunol.* 2002;3:151-158.
82. Rousseau S, Dolado I, Beardmore V, et al. **CXCL12 and C5a trigger cell migration via a PAK1/2-p38alpha MAPK-MAPKAP-K2-HSP27 pathway.** *Cell Signal.* 2006 Mar 6; [Epub ahead of print] 8.
83. McLeod SJ, Shum AJ, Lee RL, Takei F, Gold MR. **The Rap GTPases regulate integrin-mediated adhesion, cell spreading, actin polymerization, and Pyk2 tyrosine phosphorylation in B lymphocytes.** *J Biol Chem.* 2004; 279: 12009-19.
84. Gu Y, Filippi MD, Cancelas JA, et al. **Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases.** *Science.* 2003;302:445-449.



85. Yang FC, Atkinson SJ, Gu Y, et al. **Rac and Cdc42 GTPases control hematopoietic stem cell shape, adhesion, migration, and mobilization.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:5614-5618.
86. Alblas J, Ulfman L, Hordijk P, Koenderman L. **Activation of RhoA and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes.** *Mol Biol Cell.* 2001;12:2137-2145.
87. Zhou H, Kramer RH. **Integrin engagement differentially modulates epithelial cell motility by RhoA/ROCK and PAK1.** *J Biol Chem.* 2005;280:10624-10635.
88. Hall A. **Rho GTPases and the actin cytoskeleton.** *Science.* 1998;279:509-514.
89. Cau J, Hall A. **Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways.** *J Cell Sci.* 2005; 118: 2579-2587.
90. Wilkinson S, Paterson HF, Marshall CJ. **Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion.** *Nat Cell Biol.* 2005; 7: 255-261.
91. Fong AM, Premont RT, Richardson RM, Yu YR, Lefkowitz RJ, Patel DD. **Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 7478-7483.
92. Noritake J, Watanabe T, Sato K, Wang S, Kaibuchi K. **IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration.** *J Cell Sci.* 2005; 118: 2085-2092.
93. Ahn J, Febbraio M, Silverstein RL. **A novel isoform of human Golgi complex-localized glycoprotein-1 (also known as E-selectin ligand-1, MG-160 and cysteine-rich fibroblast growth factor receptor) targets differential subcellular localization.** *J Cell Sci.* 2005;118:1725-1731.
94. Dimitroff CJ, Lee JY, Rafii S, Fuhlbrigge RC, Sackstein R. **CD44 is a major E-selectin ligand on human hematopoietic progenitor cells.** *J Cell Biol.* 2001;153:1277-1286.
95. Watt SM, Butler LH, Tavian M, et al. **Functionally defined CD164 epitopes are expressed on CD34(+) cells throughout ontogeny but display distinct distribution patterns in adult hematopoietic and nonhematopoietic tissues.** *Blood.* 2000;95:3113-3124.
96. Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, von Andrian UH, Wagner DD. **Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:14423-14428.

97. Yamamoto S, Higuchi Y, Yoshiyama K, et al. **ADAM family proteins in the immune system.** *Immunol Today.* 1999;20:278-284.
98. Bengtson P, Lundblad A, Larson G, Pahlsson P. **Polymorphonuclear leukocytes from individuals carrying the G329A mutation in the alpha 1,3-fucosyltransferase VII gene (FUT7) roll on E- and P-selectins.** *J Immunol.* 2002;169:3940-3946.
99. Zawistowski JS, Serebriiskii IG, Lee MF, Golemis EA, Marchuk DA. **KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (CCM1) pathogenesis.** *Hum Mol Genet.* 2002;11:389-396.
100. Tanaka SS, Yamaguchi YL, Tsoi B, Lickert H, Tam PP. **IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion.** *Dev Cell.* 2005; 9: 745-756.
101. Krawczenko A, Kieda C, Dus D. **The biological role and potential therapeutic application of interleukin 7.** *Arch Immunol Ther Exp.* 2005; 53: 518-525.
102. Eid JE, Kung AL, Scully R, Livingston DM. **p300 interacts with the nuclear proto-oncoprotein SYT as part of the active control of cell adhesion.** *Cell.* 2000; 102: 839-848.
103. Lee BC, Cheng T, Adams G, et al. **P2Y-like receptor, GPR105 (P2Y<sub>14</sub>), identifies and mediates chemotaxis of bone marrow hematopoietic stem cells.** *Genes and Development.* 2003;17:1592-1604.
104. Kimura T, Boehmler AM, Seitz G, et al. **The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34<sup>+</sup> progenitor cells.** *Blood.* 2004;103:4478-4486.
105. Bonig H, Priestley GV, Nilsson LM, Jiang Y, Papayannopoulou T. **PTX-sensitive signals in bone marrow homing of fetal and adult hematopoietic progenitor cells.** *Blood.* 2004;104:2299-2306.
106. Papayannopoulou T, Priestley GV, Bonig H, Nakamoto B. **The role of G-protein signaling in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization.** *Blood.* 2003;101:4739-4747.

107. Bautz F, Denzlinge C, Kanz L, Moehle R. **Chemotaxis and transendothelial migration of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells induced by inflammatory mediator leukotriene D4 are mediated by the 7-transmembrane receptor CysLT1.** *Blood.* 2001;97:3433-3440.
108. Lapidot T, Dar A, Kollet O. **How do stem cells find their way home?** *Blood.* 2005;106:1901-10.
109. Ponomaryov T, Peled A, Petit I, et al. **Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function.** *J Clin Invest.* 2000;106:1331-1339.
110. la Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. **Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides.** *J Leuk Biol.* 2003;73:339-343.
111. Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. **Bone marrow as a source of circulating CXCR4<sup>+</sup> tissue-committed stem cells.** *Biol. Cell.* 2005;97:133-146.
112. Juarez J, Bendall L. **SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis.** *Histol Histopathol.* 2004 Jan;19(1):299-309.
113. Ivanova EP, Alexeeva YV, Pham DK, Wright JP, Nicolau DV. **ATP level variations in heterotrophic bacteria during attachment on hydrophilic and hydrophobic surfaces.** *Int Microbiol.* 2006 Mar;9(1):37-46.
114. Chivasa S, Ndimba BK, Simon WJ, Lindsey K, Slabas AR. **Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plant cell viability.** *Plant Cell.* 2005 Nov;17(11):3019-34. Epub 2005 Sep 30.
115. Koshlukova SE, Araujo MW, Baev D, Edgerton M. **Released ATP is an extracellular cytotoxic mediator in salivary histatin 5-induced killing of *Candida albicans*.** *Infect Immun.* 2000 Dec;68(12):6848-56.
116. Sbarbati A, Osculati F. **Allelochemical communication in vertebrates: kairomones, allomones and synomones.** *Cells Tissues Organs.* 2006;183(4):206-19. Review.

---

## RINGRAZIAMENTI

---

*Se non fosse per l'aiuto prezioso, la collaborazione ed i consigli di molte persone, questa tesi non esisterebbe neppure.*

*I miei ringraziamenti, per quello che un semplice "grazie" può contare, vanno:*

*- al Prof. Lemoli, per il sostegno, la disponibilità e la fiducia;*

*- a tutti i membri, passati e presenti, del Lab: Antonio, Elisa, Giovanna, Michela, Miriam, Simona e Valentina. Un grazie al quadrato a Miriam, Valentina, Michela e Giovanna per aver portato pazientemente a termine gli ultimi esperimenti necessari alla conclusione del progetto;*

*- alla Prof.ssa Rossella Manfredini, al Prof. Sergio Ferrari, alle Dott.sse Roberta Zini e Simona Salati dell'Università di Modena e Reggio Emilia, per il prezioso contributo e la paziente analisi dei profili trascrizionali mediante Microarray;*

*- al Prof. Francesco Di Virgilio, al Dott. Davide Ferrari e alle Dott.sse Sara Gulinelli ed Elena Adinolfi dell'Università di Ferrara, per le analisi biochimiche;*

*- al Prof. Francesco Bertolini e ai suoi collaboratori dell'Istituto Tumori di Milano, per l'allestimento dei saggi in vivo nei topi.*

*Ai miei tutor, che mi hanno pazientemente assistito durante questi tre anni di Dottorato, il Prof. Roberto Lemoli e la Dott.ssa Lucia Catani, ritengo inopportuno rivolgere un banale "ringraziamento ufficiale". A loro, un grazie di cuore.*

*A Nicole, l'amica di sempre.*

*A Ghigo, per gli innumerevoli favori che gli devo (per i quali non basta un semplice grazie, ma penso che dovrò prima o poi offrirgli anche una cena!).*

*Agli amici, italiani, americani e a quelli che, sospesi nel limbo dell'emigrazione, non sono ne' l'uno ne' l'altro.*

*Alla mia famiglia, cui oltre la dedica di questa tesi, va anche il mio grazie piu' grande: per avermi lasciato andare, senza smettere mai di aspettarmi.*

---

## BIOLOGIA DELL'EMIGRAZIONE

---

*Il mio collega di laboratorio Stuart ha una teoria: tutti gli scienziati, prima o poi, finiscono per assomigliare al modello che studiano.*

*Più che una teoria, suona come un corollario alla Legge di Murphy sul destino...*

*Quando ci penso, però, non posso fare a meno di sorridere. Intendo, quando penso che, dopo aver dedicato più di due anni a studiare la migrazione delle cellule staminali, sia finita io stessa per emigrare, in nome della scienza.*

*La parola emigrante è azzurra, ma come è azzurra una giornata di sole. Se ci penso non è solo azzurra; ha il sapore del sale. E' come un sorso di acqua di mare per un naufrago: racchiude in sé la speranza che ti tolga la sete, e la bevi perché non puoi farne a meno. Ma poi ti lascia con il sapore amaro della sete che non hai placato.*

*Capita che, a volte, la parola emigrante abbia il ritmo accelerato di una fuga: allora si tinge del colore rosso dell'ansia e del grigio dell'imbarazzo, quando i tuoi documenti, il tuo visto, la tua persona vengono trattati come quelli di un potenziale criminale, per il semplice fatto che di cognome non fai Smith.*

*Ma a volte, sì, la parola emigrante si veste di velluto amaranto come l'avventura e ogni giorno ha in sé il sapore della conquista, di un piccolo passo avanti per la tua piccola frontiera.*

*Tra tutti i difetti, la parola emigrante ha soprattutto questo: la paura degli specchi. Basta il riflesso in un vetro: "etnargime" e il viaggio della mente riparte veloce all'incontrario. Vertiginoso come i ricordi, il viaggio verso casa.*

*Quando i viaggi verso casa si fanno troppo frequenti, cerco di farmi coraggio ripensando alla frase sul mio sussidiario di terza elementare: "ciò che caratterizza Homo Sapiens rispetto a tutte le altre specie animali è l' elevata capacità di adattamento".*

*Se non sbaglio, del sopraccitato HS, io dovrei essere la cugina Homo Sapiens Sapiens e, a quanto pare, è proprio il mio Sapiens al quadrato a rendermi una (potenziale)*

*ottima emigrante, con (quasi) ottimali capacità di adattamento a nuovi ambienti, a nuovi alimenti, a nuovi agenti patogeni, ad un nuovo clima e, perché no?, anche ad una diversa forma di linguaggio, di cultura, di etica e di senso estetico.*

*Con la sua valigia carica di tutto questo, HSS ha colonizzato il mondo e, allo stesso tempo, si è arrampicato lentamente sulla piramide evolutiva, fino a conquistare il suo posto proprio lassù, sul vertice.*

*Il povero HSS però non sapeva, e non lo sapevo neanche io, prima di partire, che la sua valigia aveva un contenuto prezioso, quanto pericoloso. Perché la sua ottima capacità di adattamento è intrinsecamente plasmata sulla capacità di ricordare. HSS si può "adattare" e creare nuove forme di adattamento, solo "ricordando" e partendo da quello che, in un passato vissuto o evolutivo, ha già sperimentato.*

*Non c'è da stupirsi quindi, che da lassù, nel lussuoso isolamento del vertice evolutivo, HSS a volte non sappia resistere alla tentazione di alzare lo sguardo per godere dell'ottima vista e cercare il profilo della sua terra di origine.*

*Lo fa ancora adesso, anno 2007, nonostante internet, e skype, e messenger e i veloci collegamenti intercontinentali.*

*Lo faccio anche io, quasi ogni giorno.*

*Se il cielo è terso, mi sembra quasi di vedere casa.*