

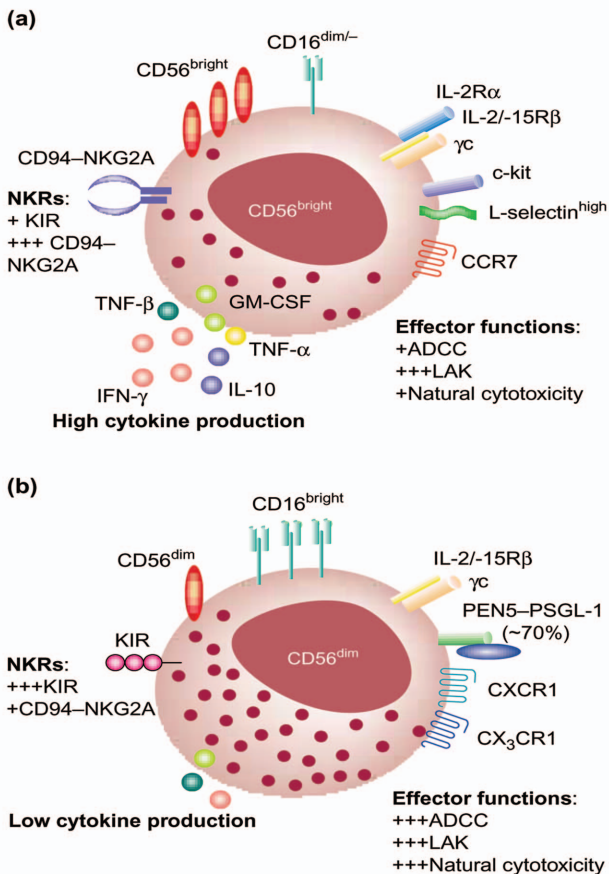


Figura 1. Sottopopolazioni delle cellule NK umane.

a) CD56^{bright} CD16^{dim}, subset con funzioni immunoregatorie;

b) CD56^{dim} CD16^{bright}, subset con funzioni effettrici.

Da Cooper et al., (Trends in Immunology, 2001).

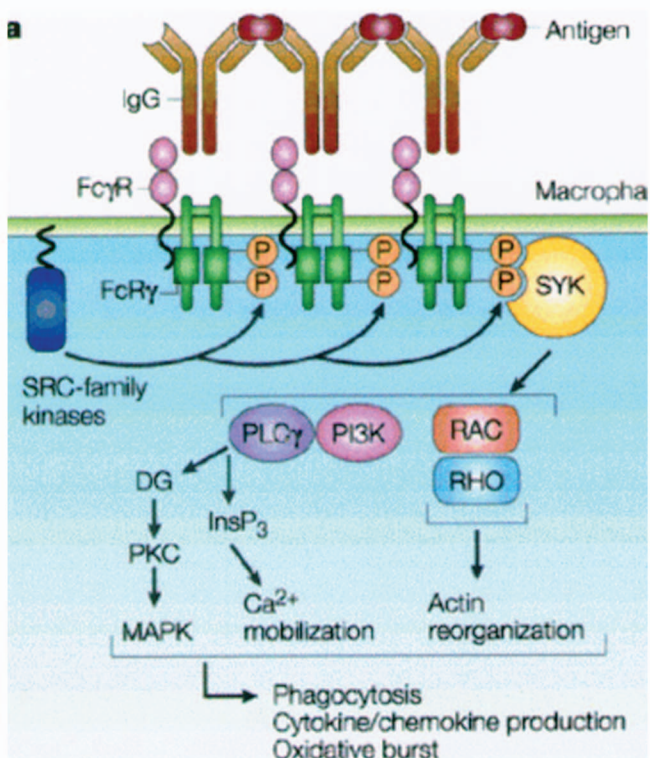
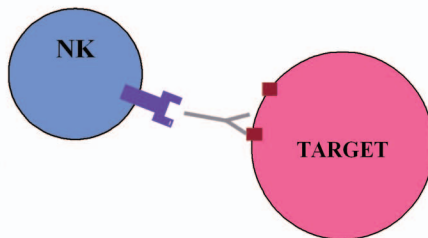
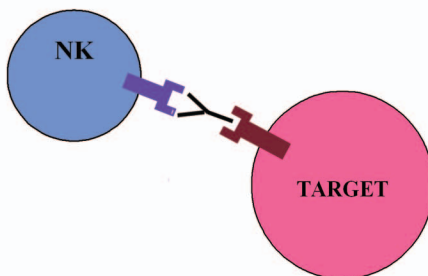


Figura 2. *Trasduzione del segnale mediata dal recettore CD16.*
(modificato da T. Takai, Nature Rev. Immunol. 2002, 2: 580-592).

**Conventional
ADCC**



**Redirected
killing**



CD16



FcγR



anti-CD16



Ig solubili

Ag

Figura 3. *Meccanismi litici CD16-mediati nelle cellule NK*

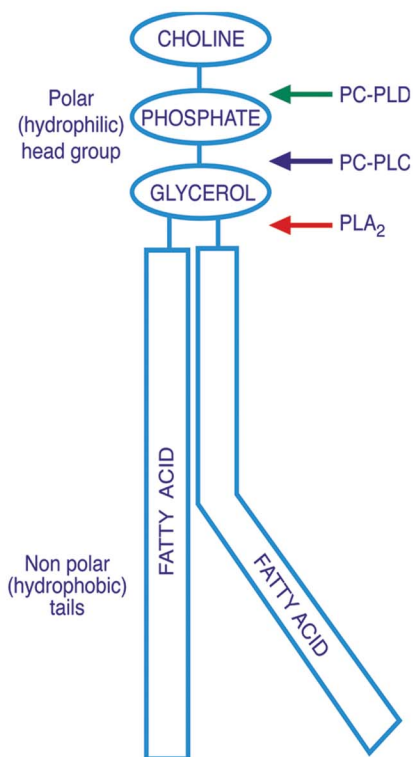


Figura 4. Siti di taglio delle differenti fosfolipasi sul substrato lipidico.

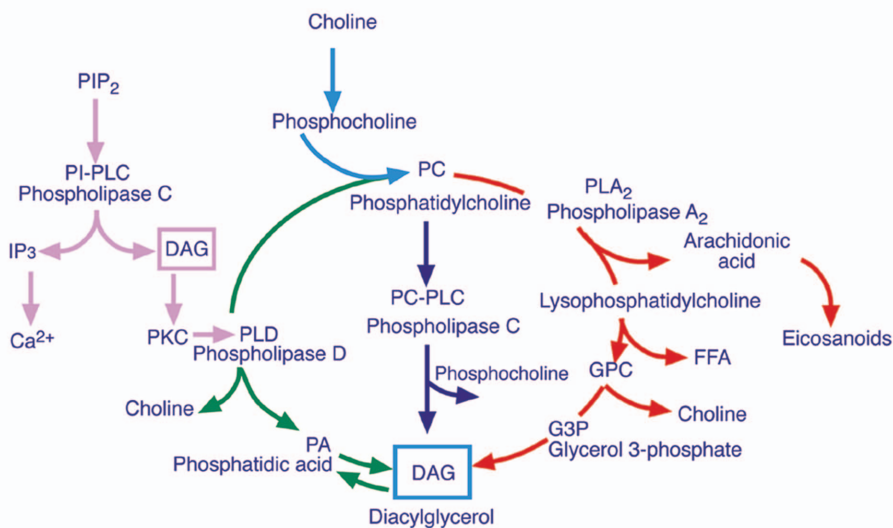


Figura 5. *Ciclo della fosfatidilcolina.*

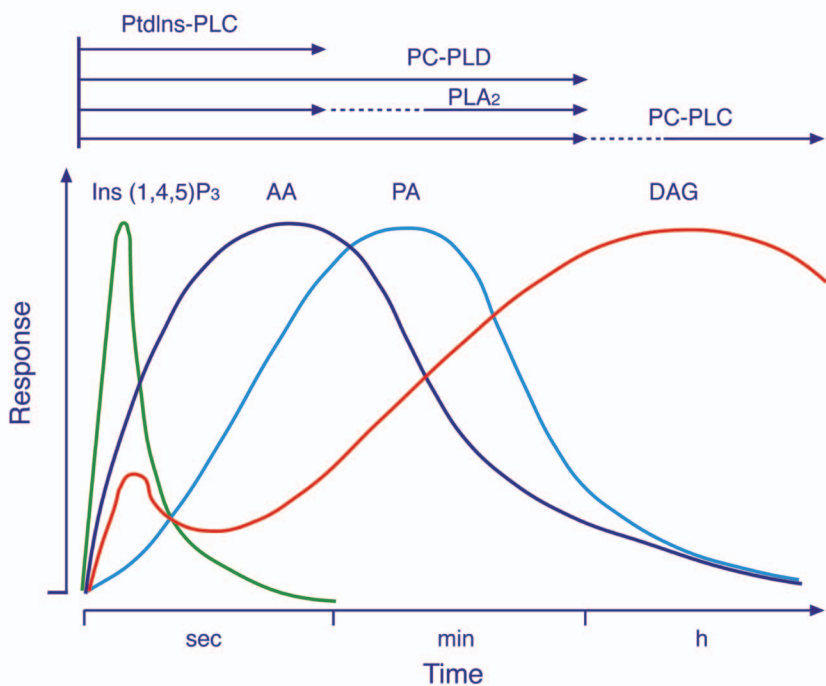


Figura 6. Cinetica della produzione di secondi messaggeri lipidici.

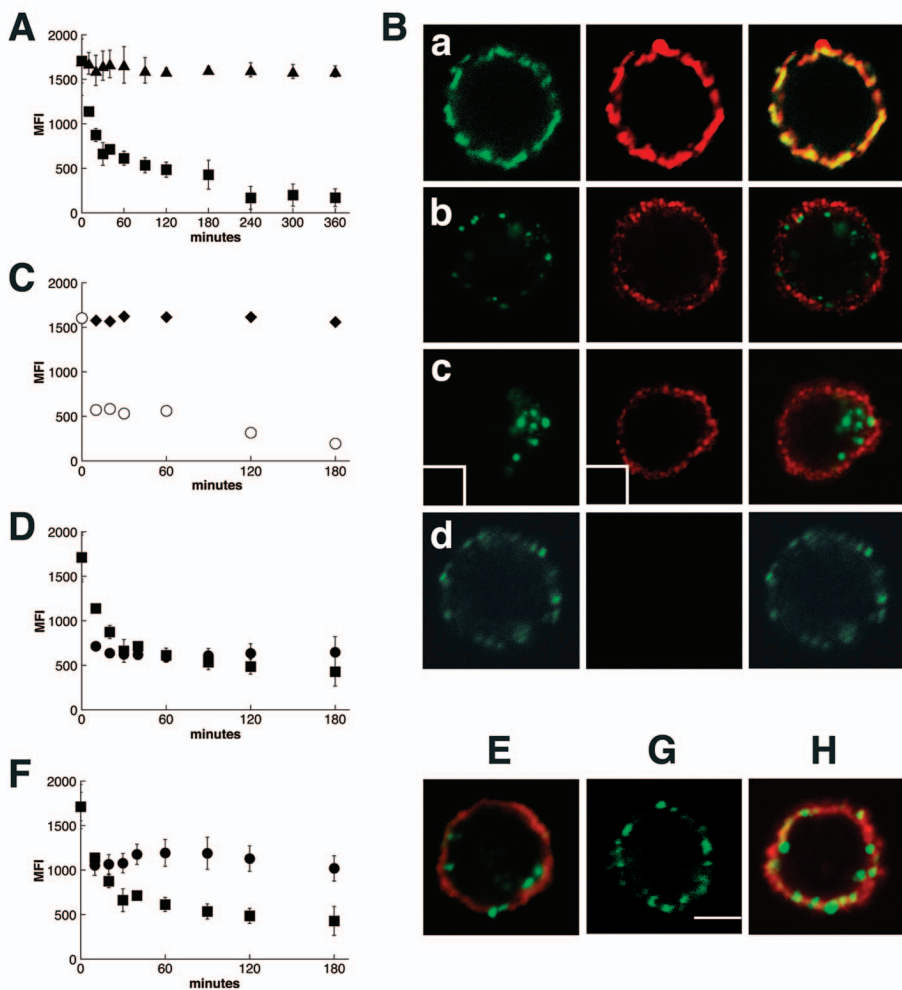


Figura 7. *Endocitosi anticorpo-mediata del recettore CD16.*

A) Cellule NK resting purificate (da 8 donatori sani) sono state incubate con l'anti-CD16-FITC (30 min, 4°C), messe in coltura a 37°C (?) o mantenute a 4°C (?) per i tempi indicati in ascissa, e successivamente analizzate al FACS (A).

Nel pannello B sono mostrate cellule NK resting marcate con l'anti-CD16 (verde) e poi messe in coltura a 37°C per 0 (a), 10 min (b), 30 min (c) in terreno completo o in presenza di CHX (50 µg/ml, 30 min) (d). Dopo lavaggi le cellule sono state nuovamente marcate in membrana con l'anti-CD16 (3G8, rosso). Le regioni di co-localizzazione sono mostrate in giallo.

C) Analisi al FACS di cellule NK resting, ingaggiate con l'anticorpo anti-CD16 (B73.1), coltivate in terreno completo (◆) o in presenza di CHX (?) e marcate in membrana con l'anti-CD16 (3G8, di cui è riportata l'intensità di fluorescenza nei tempi indicati) (C).

D, F) Analisi al FACS di cellule NK resting purificate (da 5 donatori sani) incubate con: NaN3 (80 mM, 1h, D, ?), Jaspilaknolide (10 µM, 30 min, F, ?) o con terreno completo (?), marcate in membrana con l'anti-CD16, e messe in coltura a 37°C per i tempi indicati prima di essere analizzate. MFI = Mean Fluorescence Intensity. Ogni singolo punto nel diagramma rappresenta la media della MFI ± SD.

Le cellule trattate come descritto precedentemente (E, NaN3; G, Jaspilaknolide; H, control) sono state osservate anche al CLSM, dopo essere state fissate con PFA 3% e incubate con la falloidina (mostrata in rosso). Tutte le immagini rappresentano una singola sezione centrale di una cellula rappresentativa del campo analizzato. La barra è uguale a 5 µm. Gli inserti nel pannello c mostrano la marcatura del solo anticorpo secondario (GαM).

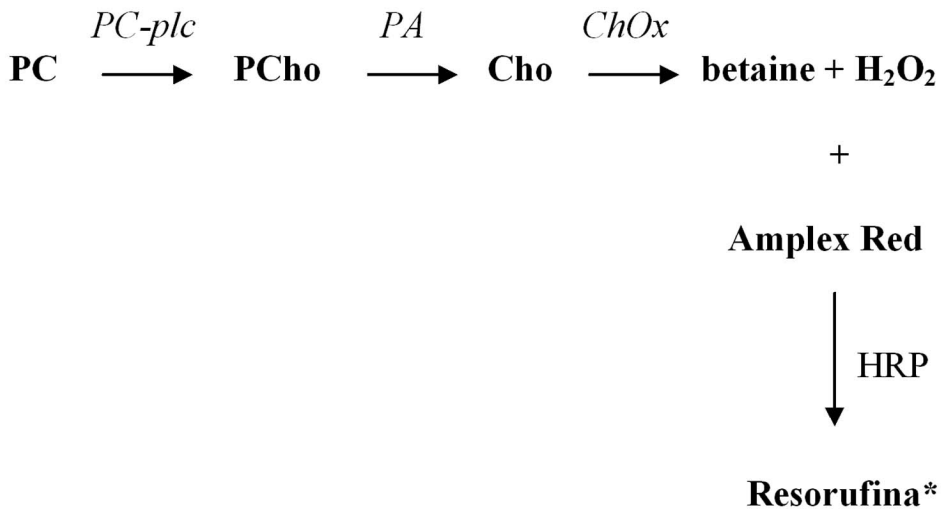
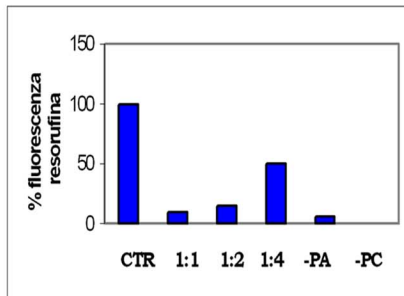
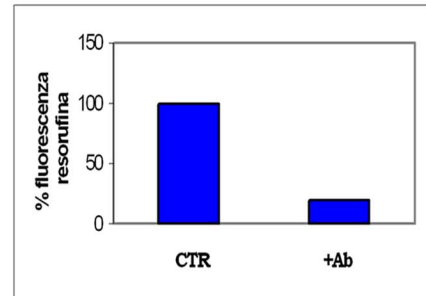
A**B****C**

Figura 8. *Specificità dell'anticorpo policlonale anti-PC-PLC.*

Schema delle reazioni enzimatiche del kit Amplex Red (A). PC fosfatidilcolina, PC-PLC fosfolipasi C specifica per fosfatidilcolina, PCho fosfocolina, PA fosfatasi alcalina, Cho colina, ChOx colina ossidasi, HRP horseradish peroxidase.

Test di attività effettuato sull'anticorpo policlonale anti-PC-PLC, prodotto nel nostro laboratorio, con lisati di cellule NIH 3T3. Nel pannello B è riportata la percentuale di fluorescenza prodotta dalla resorufina dopo aver allontanato l'anticorpo e il suo ligando dal lisato cellulare. I valori 1:1, 1:2, 1:4 indicano i rapporti tra quantità di anticorpo incubato e di lisato cellulare. Nel pannello C è mostrata l'attività enzimatica della PC-PLC in presenza dell'anticorpo solubile nel lisato cellulare.

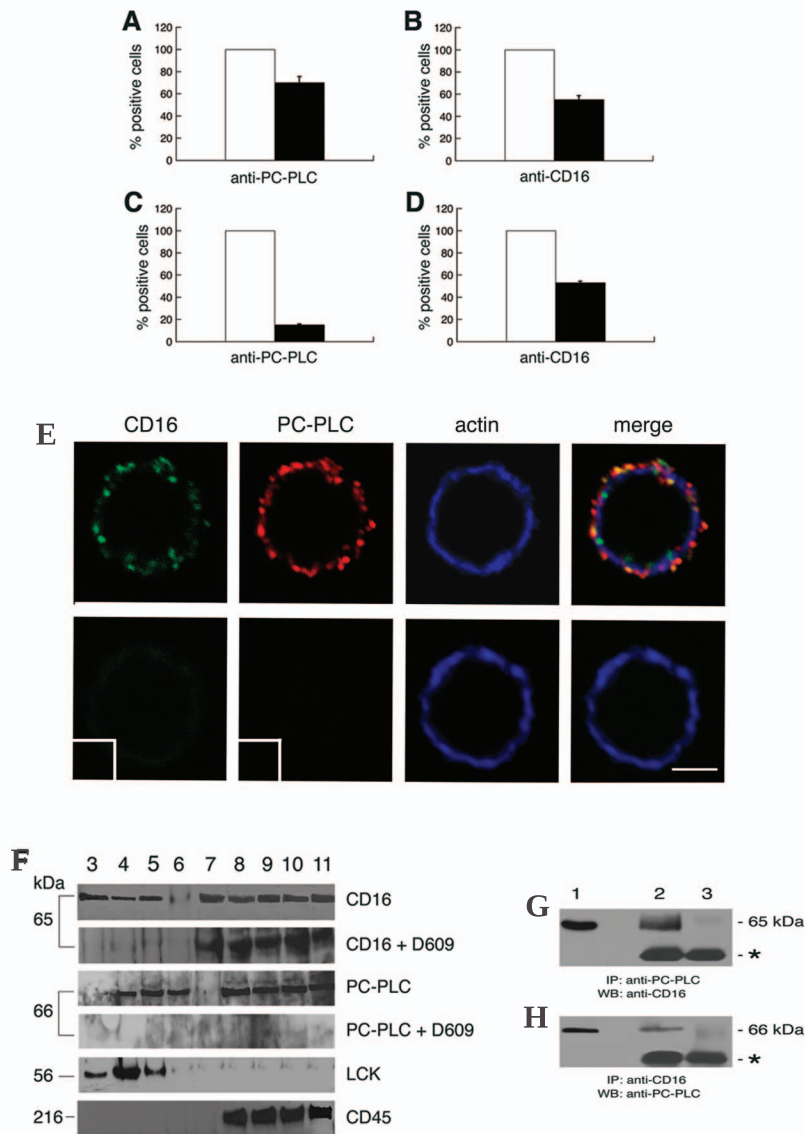


Figura 9. Regolazione PC-PLC-mediata del recettore CD16 dalla membrana plasmatica delle cellule NK.

Pannelli A-D. Analisi al FACS di cellule NK purificate (da 6 donatori) resting (A, B) o attivate con IL-2 (C, D, 100 U/ml per 3 giorni), coltivate in presenza di D609 (50 μ g/ml, 15 min, colonne nere) o in terreno completo (colonne bianche). Dopo lavaggi le cellule sono state incubate con l'anticorpo anti-PC-PLC (A, C) o con l'anti-CD16 (B, D). I valori rappresentano la media della MFI $\pm$ SD delle cellule trattate con D609, normalizzate rispetto ai controlli.

Nel pannello E è mostrata una sezione centrale di una cellula NK resting, rappresentativa tra quelle analizzate al CLSM, marcata con l'anticorpo anti-PC-PLC (rosso), con l'anti-CD16 (verde) e, dopo fissazione con PFA 3%, marcata con falloidina (blu). Nel pannello superiore è riportata una cellula di controllo, mentre in quello inferiore è rappresentata una cellula incubata con D609 (50 μ g/ml, 15 min). La barra misura 5 μ m. Negli inserti è riportata la fluorescenza relativa al solo anticorpo secondario.

Pannello F. Analisi di Western Blot su frazioni cellulari ottenute da gradiente di saccarosio, dove indicato le cellule NK attivate con IL-2 sono state pre-incubate con il D609 per 40 min prima della lisi. La posizione dei microdomini di membrana è identificata dall'anti-Lck, mentre le frazioni Triton-solubili sono CD45⁺.

Pannelli G, H. Esperimenti di co-immunoprecipitazione effettuati con anticorpo anti-PC-PLC o con anti-CD16, e seguiti da Western Blot con gli anticorpi reciproci. L'asterisco indica la catena pesante delle IgG.

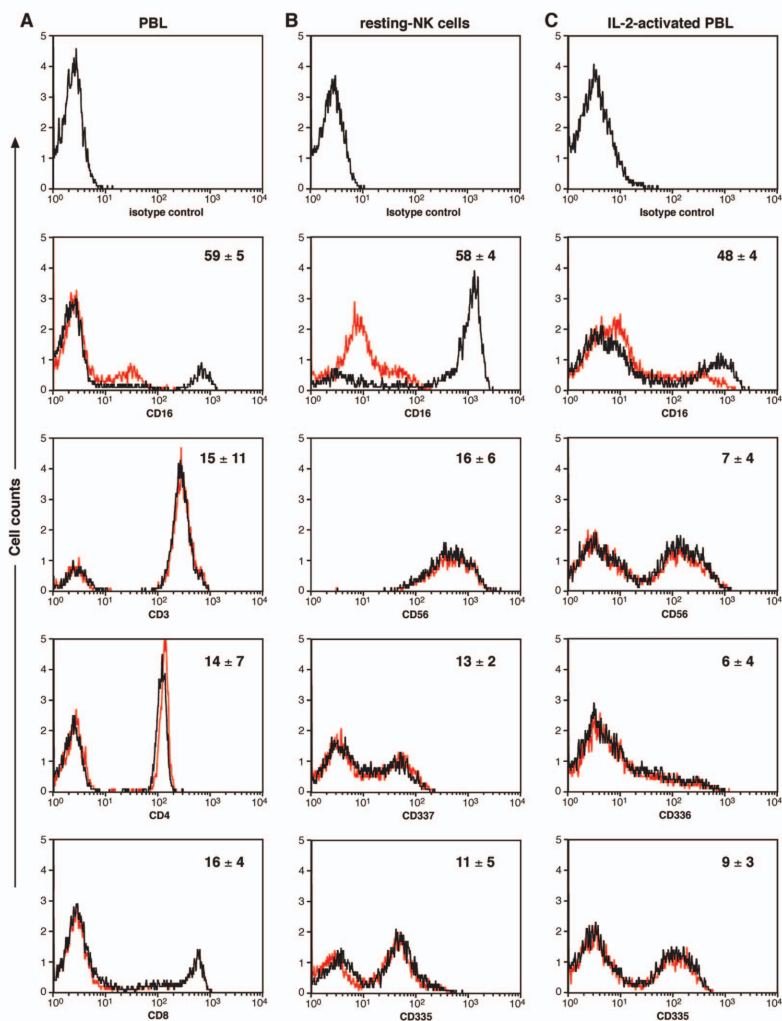


Figura 10. Effetto specifico del D609 sulla down-modulazione della membrana plasmatica del recettore CD16.

Analisi al FACS di PBL freschi isolati dal sangue periferico umano (A), di cellule NK resting (B), e di PBL attivati con IL-2 (C), incubati con gli specifici anticorpi diretti contro i cluster di differenziazione indicati. Gli istogrammi rappresentano le fluorescenze relative di un donatore sano, le linee rosse indicano il trattamento con D609 (50 µg/ml, 15 min), mentre le linee nere indicano i rispettivi controlli. I valori riportati all'interno di ogni singolo istogramma rappresentano la media ± SD della down-modulazione indotta dal D609 su sei donatori analizzati.

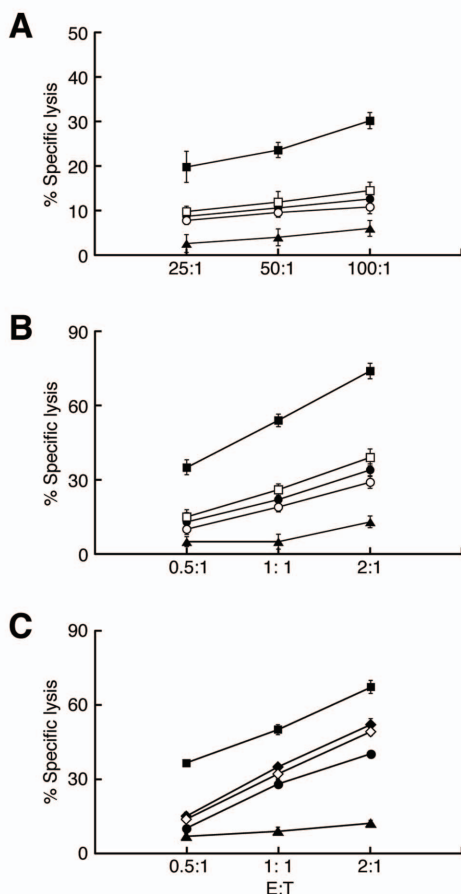


Figura 11. *Effetto dell'inibizione dell'enzima PC-PLC nei meccanismi litici CD16-mediati.*

L'attività citolitica è stata misurata mediante citofluorimetria a flusso (per ulteriori dettagli vedere la sezione Materiali e Metodi). PBL (A) e NK purificate attivate con IL-2 (B e C) sono state utilizzate come cellule effettrici, e cellule della linea P815 come cellule target. Il redirected killing contro le P815 è stato analizzato dopo aver incubato le cellule effettrici con l'anticorpo anti-CD16 (B73.1, ?) o dopo aver pre-incubato gli effettrici con il D609 (50 µg/ml, 40 min, ?). L'attività litica misurata dopo l'incubazione con l'anti-NKp46 è indicata da ◆, mentre quella valutata dopo il trattamento con il D609 è mostrata da ◇ (pannello C). La citotossicità misurata in assenza di anticorpo è stata considerata come citotossicità naturale ed è indicata da ? in tutti i pannelli. E' stata anche valutata l'attività citolitica delle cellule effettrici incubate con anticorpi non correlati (anti-CD4, ?) e con frammenti F(ab')₂ dell'anti-CD16 (?) (pannelli A e B). I dati mostrati rappresentano un esperimento di quattro eseguiti in triplicato e aventi risultati simili.

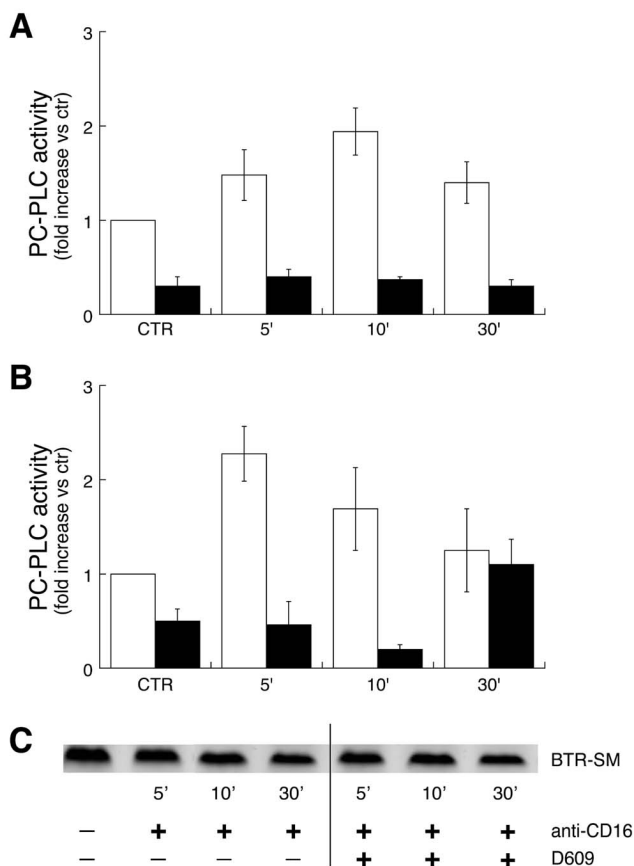


Figura 12. Attività enzimatica della PC-PLC e della sfingomielin sintasi (SMS) dopo stimolazione del recettore CD16.

Saggi enzimatici Ampex Red sono stati condotti su cellule NK resting purificate (A) e attivate da IL-2 (B). Le cellule sono state incubate con l'anti-CD16 (B73.1), seguito dall'anticorpo secondario e poi messe in coltura terreno completo (colonne bianche) a 37°C per i tempi indicati, oppure sono state per-incubate con l'inibitore D609 (50 µg/ml, 40 min, colonne nere) e successivamente lavate prima dell'incubazione con gli anticorpi. L'attività della PC-PLC è stata misurata nel controllo non trattato a 10 min. I dati rappresentano la media $\pm$ SD di cinque esperimenti indipendenti.

L'attività della SMS (pannello C) è stata misurata in cellule NK attivate con IL-2 stimulate con gli stessi anticorpi indicati nell'esperimento precedente e con le stesse condizioni. I lipidi estratti sono stati risolti mediante TLC e la formazione del prodotto della SMS, la BTR-sfingomielina, è stata quantificata determinandone l'intensità di fluorescenza. In figura è mostrato uno di quattro esperimenti eseguiti.

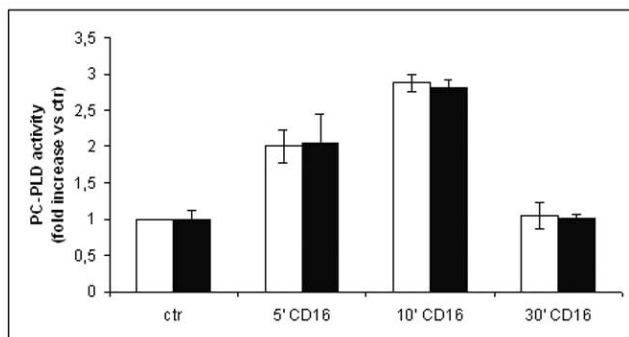
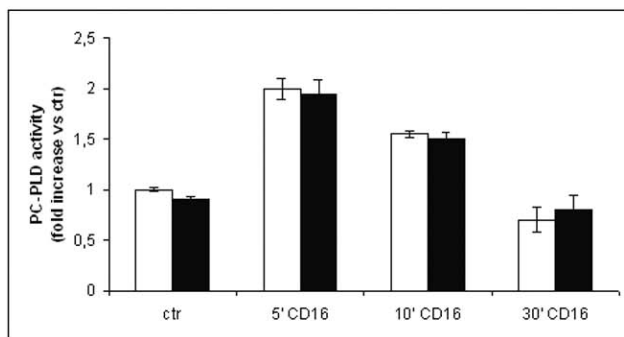
A**B**

Figura 13. *Attività enzimatica della PC-pld a seguito di stimolazione del recettore CD16.*

Nel pannello A è riportata l'attività enzimatica della PC-pld misurata nelle cellule NK resting (con le stesse modalità riportate per la valutazione dell'attività della PC-PLC). Nel pannello B è mostrata l'attività dell'enzima PC-pld nelle cellule NK attivate con IL-2. Le colonne nere indicano i trattati con D609 (50 µg/ml, 40 min), mentre le colonne bianche indicano i controlli. I dati rappresentano la media $\pm$ SD di cinque esperimenti indipendenti eseguiti.

CTR	100%
5' α -CD16	87 $\pm$ 2%
10' α -CD16	83 $\pm$ 4%
30' α -CD16	77 $\pm$ 3%
D609 + 5' α -CD16	82 $\pm$ 5%
D609 + 10' α -CD16	82 $\pm$ 3%
D609 + 30' α -CD16	72 $\pm$ 4%

Tabella 1. *Attività enzimatica della sfingomielin sintasi (SMS) dopo stimolazione del recettore CD16.*
Le cellule NK attivate con IL-2 sono state ingaggiate con l'anticorpo anti-CD16 per i tempi indicati, oppure pre-incubate con l'inibitore D609 prima della stimolazione del recettore. In tabella sono riportati i valori medi di densitometria $\pm$ SD, normalizzati rispetto al controllo, relativi alla BTR-sfingomielina, prodotta in quattro esperimenti indipendenti.