



## DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE

Dr.ssa Alessandra Ali

### Attività scientifica svolta nel 2° anno di Dottorato, Anno Accademico 2016/2017

**Tutor:** Prof.ssa Alessandra Gamberucci

**1. Introduzione:** Il recettore purinergico P2X7(P2X7R) svolge un ruolo fondamentale nei meccanismi pro-infiammatori innescati dal rilascio di ATP da cellule danneggiate; crescenti evidenze dimostrano il suo coinvolgimento anche nello sviluppo della fibrosi tissutale in diversi distretti corporei(1;2). Da qui il nostro interesse sul ruolo del P2X7R in patologie come la *Sclerosi Sistemica(SSc)*(3) e lo *Scompenso Cardiaco Cronico(CHF)*. Questo recettore oltre ad esser espresso in gran parte in cellule immunitarie, è presente in una vasta gamma di fibroblasti(4) compresi fibroblasti dermici(DFs) e cardiaci(CFs). L'obiettivo dello studio è quello di esaminare espressione e funzione del P2X7R nei DFs e CFs da pazienti affetti rispettivamente da SSc e con CHF rispetto ai fibroblasti di controllo e correlarli all'espressione di alpha-Smooth muscle Actin( $\alpha$ -SMA), della citochina connective tissue growth factor(CTGF) e alla produzione di collagene, analizzando anche le vie di signaling implicate.

**Metodiche utilizzate:**

Isolamento: -CFs da biopsie di auricola in pazienti CHF sottoposti ad intervento chirurgico o - DFs da biopsie di derma in pazienti SSc, su questi e su cellule di controllo:

- Reazione di Immunofluorescenza(IF) per Vimentina ed  $\alpha$ -SMA → verificare purezza e differenziamento in miofibroblasti;
- Western Blot per misurare p-ERK;
- Stimolazione del P2X7R e successiva misurazione della produzione di collagene e di CTGF tramite ELISA colorimetrico( $\pm$ inibitori P2X7R).

**Risultati:** l'attivazione del P2X7R, espresso in CFs e DFs, è coinvolta nella iperespressione di  $\alpha$ -SMA, nel rilascio di CTGF, nella produzione di collagene e nell'attivazione della via ERK-MAPK-chinasi.

**2. Introduzione:** Un nuovo meccanismo di difesa dei neutrofili scoperto negli ultimi anni consiste nel rilascio all'esterno della cellula di filamenti di cromatina decondensata e costituenti dei granuli sotto forma di Neutrophil extracellular traps(NETs)(1). I NETs sono anche coinvolti nella patogenesi di malattie autoimmuni ed infiammatorie, incluse artropatie microcristalline quali gotta e pseudogotta(2). Lo scopo dello studio è quello di valutare l'espressione dei NETs indotti da cristalli nel liquido sinoviale di pazienti in corso di attacco acuto di gotta o pseudogotta ed analizzare i meccanismi molecolari alla base della formazione dei NETs.

**Metodiche utilizzate:**

- Valutazione dei NETs tramite colorazione con SYTOX Green, DAPI e reazione di IF verso Elastasi(NE) e istone H3 citrullinato;
- Quantizzazione fluorimetrica dei NETs presenti nei campioni;
- Preparazione di lisati cellulari e valutazione quantitativa della protein-chinasi fosfo-MLKL, implicata nella formazione dei NETs tramite Western Blot.

**Risultati:** I risultati fin qui ottenuti mostrano un'iperespressione di NETs e della proteina fosfo-MLKL sia nei pazienti con gotta che pseudogotta rispetto ai neutrofili periferici usati come controlli negativi. La presenza dei NETs è confermata da DNA, NE ed H3-citrullinato extracellulare.

### **Seminari presso il Polo di San Miniato, Siena**

- "Calcium Entry Units : discovery of junctions that promote colocalization of STIM1 and ORAI1 in skeletal muscle" – Prof. F. Protasi – Università G. D'Annuzio, Chieti - 26.10.2016
- "Between life and death. The dual function of mitochondrial ATP synthase" – Prof. P. Bernardi – Università di Padova – 25.1.2017

### **Seminari presso Policlinico Santa Maria Alle Scotte, Siena**

- Febbri periodiche – Dr. L. Cantarini – Azienda Ospedaliera Universitaria Senese - 29.3.2017

### **Ciclo di Seminari presso Complesso dei Servi e Santa Chiara Auditorium- Liaison Office- Corsi trasversali per dottorandi**

#### **-START UP AND TECHNOLOGY TRANSFER**

##### **Modulo 1: Start up and Technology Transfer**

- "Entrepreneurship and business start up"- Prof. L. Zanni – Università di Siena – 14.11.2016
- "Science, Park, Incubator Organization and case study of Academic Entrepreneurship" – Dr. F. M. Senatore – Business Development, Toscana Life Sciences Foundation – 15.11.2016

##### **Modulo 2: Intellectual Property Rights**

- Definizione di brevetto; Valorizzazione dei brevetti; Requisiti di brevettabilità: novità, attività inventiva, liceità, applicabilità industriale, territorialità, dalla domanda al brevetto; Ricerche di anteriorità, deposito, esame, pubblicazione, rilascio; Accordi: MTA-NDA-Option-License; Gestione dei brevetti, innovazione e trasferimento tecnologico – Dr. A. Frosini – Intellectual Property Manager, Toscana Life Sciences Foundation – 15.11.2016

#### **-SISTEMI DI RICERCA EUROPEI: PROJECT DESIGN E GESTIONE DEI PROGETTI DI RICERCA**

##### **Modulo 1: I SISTEMI DI RICERCA EUROPEI ED IL PROJECT DESIGN**

- Project design, horizon 2020; Project Cycle Management – Dr. G. Pichillo - Addetto a supporto attività di ricerca a IZSAM G. Caporale – 18.11.2016

##### **Modulo 2: GESTIONE E RENDICONTAZIONE DEI PROGETTI DI RICERCA**

- Dall'ideazione al progetto, application form per Horizon 2020 – Dr. G. Pichillo - Addetto a supporto attività di ricerca a IZSAM G. Caporale – 18.11.2016

### **Congresso: 7th Joint Italian German Purine Club Meeting “*Advances in basic and translational purinergic research*”**

Policlinico Umberto I - Università La Sapienza – 20/22.7.2017 Roma

Partecipazione al congresso e presentazione del poster scientifico:

Titolo: "Searching novel therapeutic targets for scleroderma: P2X7-Receptor is up-regulated and promotes a fibrogenic phenotype in systemic sclerosis fibroblasts"

Autori: CAPECCHI Pier Leopoldo, ALI' Alessandra, GENTILE Daniela, VANNI Francesca, LAZZERINI Pietro Enea, GAMBERUCCI Alessandra, MORALES Maria Aurora, LAGHI-PASINI Franco

**Pubblicazione:** *Searching novel therapeutic targets for scleroderma: P2X7-receptor is up-regulated and promotes a fibrogenic phenotype in systemic sclerosis fibroblasts.* GENTILE Daniela, LAZZERINI Pietro Enea, GAMBERUCCI Alessandra, NATALE Mariarita, SELVI Enrico, VANNI Francesca, ALI' Alessandra, TADDEUCCI Paolo, DEL-RY Silvia, CABIATI Manuela, DELLA-LATTA Veronica, ABRAHAM David, MORALES Maria Aurora, FULCERI Rosella, CAPECCHI Pier Leopoldo, LAGHI-PASINI Franco, CAPECCHI Pier Leopoldo. *Frontiers in Pharmacology* 8: 638; 13 September 2017 | doi.org/10.3389/fphar.2017.00638.

- Attività di tutorato in qualità di correlatrice di tesi per gli studenti del corso di Laurea Triennale in Biotecnologie ed in Biologia in fase di tirocinio - Polo San Miniato

- Organizzazione ed attività di tutorato al progetto di divulgazione scientifica “COSTRUIAMO LA CELLULA” promosso dal Dipartimento di Medicina Molecolare e dello sviluppo durante l’evento BRIGHT- LA NOTTE DEI RICERCATORI IN TOSCANA- 29.09.2017

## BIBLIOGRAFIA

1.

- (1) Di Virgilio, F. (2007). *Liaisons dangereuses:P2X(7) and the inflammasome*. Trends Pharmacol. Sci. 28, 465–472. doi: 10.1016/j.tips.2007.07.002.
- (2) Gentile, D., Natale, M., Lazzerini, P. E., Capecchi, P. L., and Laghi-Pasini, F. (2015). *The role of P2X7 receptors in tissue fibrosis: a brief review*. Purinergic Signal 11, 435–440. doi: 10.1007/s11302-015-9466-3
- (3) GENTILE, D., LAZZERINI, P. E., GAMBERUCCI, A., NATALE, M., SELVI, E., VANNI, F., ALI', A., TADDEUCCI, P., DEL-RY, S., CABIATI, M., DELLA-LATTA, V., ABRAHAM, D., MORALES, M. A., FULCERI, R., CAPECCHI, P. L., LAGHI-PASINI, F. (2017). *Searching Novel Therapeutic Targets for Scleroderma: P2X7-Receptor Is Up-regulated and Promotes a Fibrogenic Phenotype in Systemic Sclerosis Fibroblasts*. Front. Pharmacol. 8, 638. doi.org/10.3389/fphar.2017.00638.
- (4) Caporali, F., Capecchi, P. L., Gamberucci, A., Lazzerini, P. E., Pompella, G., Natale, M., et al. (2008). *Human rheumatoid synoviocytes express functional P2X7 receptors*. J. Mol. Med. 86, 937–949. doi: 10.1007/s00109-008-0365-8

2.

- (1) Brinkmann, V. and Zychlinsky, A. (2012). *Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin?* J. Cell. Biol. 198 (5), 773. doi: 10.1083/jcb.201203170
- (2) Mulay, S. R. and Anders, H.-J. (2016). *Crystallopathies*. Engl. J. Med. 374, 2465-76. doi: 10.1056/NEJMra1601611.

SIENA 6/10/2017