



Scuola di dottorato di ricerca della Facoltà di Medicina e Chirurgia

Curriculum in Medicina Clinica e Molecolare XIV° ciclo

***L'attivazione di NLRP3 induce la sintesi di IL-18 e regola
l'integrità della barriera epiteliale***

Relatore:

Dott. Marco Marzioni

Dottoranda:

Dott.ssa Emanuela D'Agostino

Anno Accademico 2012/2015

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag. 1
1.1 ANATOMIA DELL'ALBERO BILIARE	Pag. 2
1.1.1 <i>Vascolarizzazione dell'albero biliare</i>	Pag. 4
1.1.2 <i>Innervazione dell'albero biliare</i>	Pag. 5
1.1.3 <i>Fattori che regolano la secrezione della bile</i>	Pag. 5
1.1.4 <i>Patologie dell'albero biliare</i>	Pag. 6
1.2 FUNZIONE DEI COLANGIOCITI	Pag. 9
1.2.1 <i>Trasformazione neuroendocrina dei colangiociti</i>	Pag.10
1.3 L'INFLAMMOSOMA	Pag.11
1.3.1 <i>L'inflammosoma NLRP3</i>	Pag.13
1.4 LE CITOCHINE	Pag.15
1.4.1 <i>Funzioni delle citochine</i>	Pag.16
1.4.2 <i>Recettori delle citochine</i>	Pag.17
1.4.3 <i>Interleuchina 18</i>	Pag.18
1.4.4 <i>Risposta citotossica dell'IL-18</i>	Pag.19
1.5 GIUNZIONI ADERENTI	Pag.20
1.5.1 <i>Struttura molecolare della super famiglie delle caderine</i>	Pag.20
1.5.2 <i>E-caderina</i>	Pag.21
1.5.3 <i>Regolazione dell' E-caderina</i>	Pag.22
1.6 PERMEABILITA' DELLA BARRIERA EPITELIALE	Pag.23
1.6.1 <i>La Zonulina</i>	Pag.23
2 OBIETTIVI DELLO STUDIO	Pag.25
3 MATERIALI E METODI	Pag.26
3.1 <i>Materiali</i>	Pag.26
3.2 <i>L'espressione dell'inflammosoma NLRP3 nei colangiociti</i>	Pag.26

3.3 <i>L'effetto in vitro dell'inflammosoma NLRP3 attivato nei colangiociti</i>	Pag.27
3.4 <i>Real-Time Pcr</i>	Pag.28
3.5 <i>Immunoblotting</i>	Pag.28
3.6 <i>Esperimenti di knock-down tramite SI-RNA</i>	Pag.29
3.7 <i>La risposta dei colangiociti in vivo al danno in assenza di NLRP3</i>	Pag.30
3.8 <i>Analisi statistica</i>	Pag.30
4 RISULTATI	Pag.31
4.1 <i>L'espressione di NLRP3 nei colangiociti reattivi</i>	Pag.31
4.2 <i>L'attivazione di NLRP3 induce l'espressione di il-18 e il-6, non di IL-1β</i>	Pag.32
4.3 <i>In vitro l'attivazione di NLRP3 non mostra effetti sulla proliferazione dei colangiociti ma influenza le funzioni della barriera epiteliale</i>	Pag.33
4.4 <i>NLRP3 regola la proliferazione dei colangiociti in un modello murino di colangiocite sclerosante</i>	Pag.34
5 CONCLUSIONI	Pag.35
6 DISCUSSIONE	Pag.36
7 BIBLIOGRAFIA	Pag.43
8 FIGURE	Pag.57

1. INTRODUZIONE

L'albero biliare è composto da una rete di dotti, il cui lume è fiancheggiato da cellule epiteliali chiamate colangiociti che contribuiscono alla composizione e al volume finale della bile.

Tuttavia, i meccanismi molecolari che regolano la risposta al danno dei colangiociti rimangono per buona parte oscuri, con importanti ripercussioni sullo sviluppo di terapie specifiche per il trattamento delle colangiopatie.

In particolare nelle patologie epatiche (1), una considerevole quantità di prodotti batterici chiamati PAMPs, che hanno origine nell'intestino, raggiunge il fegato tramite la circolazione portale.

Gli epatociti e le cellule di Kupffer sono le cellule maggiormente responsabili del metabolismo e della clearance di prodotti batterici quali il lipopolisaccaride (LPS). Tuttavia, forme biologicamente attive di prodotti di degradazione batterica vengono in contatto con l'epitelio biliare attraverso la bile (2,3).

Non a caso, le cellule biliari sono fornite di un ampio spettro di vie di trasduzione del segnale coinvolte nella regolazione di processi immunologici ed esprimono molecole come "nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells" (NF- κ B) e Toll-like receptor (TLRs), che reagiscono a stimoli immunitari (4).

L'inflammosoma NLRP3 è un complesso multiproteico facente parte dei componenti dell'immunità innata, appartenente ai recettori NOD-like, attivato dai PAMPs in presenza di patogeni (5).

L'NLRP3 attiva la caspasi-1 e controlla l'attività biologica di citochine pro-infiammatorie come IL-1 β , IL-18 e IL-6 (6).

In questo studio abbiamo cercato di valutare il ruolo dell'attivazione dell'infiammosoma nella risposta al danno nei colangiociti, con l'intento di migliorare la nostra conoscenza sui meccanismi fisiopatologici alla base delle colangiopatie e di individuare possibili target terapeutici.

1.1 ANATOMIA DELL'ALBERO BILIARE

L'albero biliare è una rete tridimensionale di dotti interconnessi rivestiti da cellule epiteliali, chiamate colangiociti. Tali cellule si estendono dal canale di Hering fino ai dotti biliari extraepatici.

Anatomicamente, l'albero biliare è suddiviso in intra ed extraepatico; nel fegato umano, le ramificazioni dell'albero biliare vengono suddivise in base al diametro del dotto: si riconoscono così duttuli biliari (<15 μ m), dotti interlobari (15-100 μ m), dotti settali (100-300 μ m), dotti di area (300-400 μ m), dotti segmentali (400-800 μ m) e dotti epatici (>800 μ m) (8, 9-10,11). La classificazione nel ratto prevede la distinzione tra piccoli dotti (<15 μ m) e grandi dotti (>15 μ m).

La definizione di questi due gruppi di dotti biliari nel ratto è inoltre associata alla presenza di due popolazioni eterogenee di colangiociti che li costituiscono. Queste differenze nelle caratteristiche anatomiche sottendono anche delle importanti diversità sia morfologiche che fisiopatologiche (8).

I grandi colangiociti, diversamente dai piccoli colangiociti, esprimono recettori per ormoni gastrointestinali, come la secretina (12) e rappresentano i veri protagonisti della fisiologia dell'epitelio biliare (13).

I colangiociti grandi, formano i dotti biliari grandi (8,9-10, 32,33-36), presentano una forma colonnare e sono di dimensioni progressivamente maggiori nei dotti con diametro più grande (8,9,37).

Il rapporto nucleo citoplasma è inversamente proporzionale alla dimensione del dotto; il Golgi è normalmente ben rappresentato, ed è localizzato tra il polo apicale e il nucleo (37). I ribosomi liberi sono numerosi, mentre il reticolo ruvido non è molto abbondante, ed è pressoché assente quello liscio.

Sono presenti molti lisosomi, il 30% dei quali è localizzato sul versante apicale del citosol; il nucleo è invece dislocato verso il versante basolaterale della cellula.

Nel ratto, è stato chiaramente dimostrato che la dimensione abituale della cellula, è di circa 15 μm , con una stretta relazione tra l'area della cellula e il diametro del dotto (8,9-10,32, 33-36). I dotti grandi sono costituiti da un numero di cellule significativamente maggiore rispetto al dotto di piccolo.

I colangiociti piccoli, formano i dotti piccoli; solitamente il dotto piccolo è composto da non più di 5 cellule, con un diametro che misura approssimativamente 8 μm (8,9-10,32, 33-36).

Presentano una struttura cubica irregolare (37), il rapporto nucleo citoplasma è elevato, ed il reticolo endoplasmatico rugoso è appena visibile (37,38).

Dall'altro lato, le cellule piccole, come le grandi, mostrano molti lisosomi, anche se questi ultimi sono disposti in misura maggiore vicino al polo apicale (37).

1.1.1 VASCOLARIZZAZIONE DELL'ALBERO BILIARE

La vascolarizzazione dell'albero biliare è rappresentata dal plesso peribiliare (PBP), un insieme di capillari che origina dall'arteria epatica e circonda i dotti biliari a cui è strettamente correlato.

Alterazioni nella struttura dell'albero biliare intraepatico si traducono in cambiamenti strutturali adattativi del PBP.

Sottoponendo ratti a legatura del dotto biliare (BDL) si è visto che si induce una proliferazione dei colangiociti e un aumento della massa del PBP (14,15), che assicura un apporto metabolico e gassoso alla massa biliare.

Le due popolazioni di colangiociti non ricevono la stessa vascolarizzazione. Infatti, il PBP irrorava prevalentemente i grandi colangiociti; ciò permette di spiegare il motivo per cui la proliferazione post-danno indotta ad esempio da BDL interessa prevalentemente i grandi dotti (16).

1.1.2 INNERVAZIONE DELL'ALBERO BILIARE

L'albero biliare intra ed extra-epatico è circondato da nervi autonomici che originano dal plesso celiaco (fibre simpatiche) e dal nervo vago (fibre parasimpatiche). L'innervazione è estesa anche agli epatociti e alle strutture vascolari intraepatiche.

Accanto ai neurotrasmettitori classici, adrenalina/noradrenalina e acetilcolina, le fibre vegetative rilasciano nel fegato altri neuropeptidi come NPY, CGRP, somatostatina, vasoactive intestinal polypeptide (VIP), enkcefalina e bombesina; la maggior parte dei quali si sono dimostrati capaci di influire in senso stimolatorio o inibitorio sull'attività funzionale dei colangiociti.

1.1.3 FATTORI CHE REGOLANO LA SECREZIONE DELLA BILE

Vi è un'ampia gamma di molecole, come ormoni o neuropeptidi, oltre alla secretina, in grado di stimolare la coleresi, che agiscono in modo dipendente o indipendente da essa (17,18).

La gastrina, un ormone di produzione gastrointestinale, è in grado di modulare la secrezione biliare come osservato in modelli animali, inibendo sia l'espressione del recettore della secretina, che la via intracellulare attivata da quest'ultima (19).

La somatostatina inibisce la secrezione della bile, sia a livello basale che quando indotta dalla secretina (20).

Anche ormoni di origine non intestinale, quale l'insulina, sono in grado di regolare negativamente l'azione della secretina in modelli di iperproliferazione biliare come la BDL (21). La funzione colangiocitaria può inoltre essere sotto il controllo di citochine come IL-6, IFN- γ e TNF- α che sono in grado di inibire la secrezione biliare secretino-indotta (22).

1.1.4 PATOLOGIE DELL'ALBERO BILIARE

I colangiociti sono coinvolti in un gruppo eterogeneo di disturbi biliari acquisiti o congeniti, che prendono il nome di colangiopatie.

Le colangiopatie, in condizioni colestatiche croniche, causano danno epatico. Queste patologie sono caratterizzate da una progressiva scomparsa dei dotti biliari, detta duttopenia, che deriva da un'anomala omeostasi dei colangiociti (23).

Si pensa che la duttopenia sia caratterizzata da un'eccessiva morte cellulare per apoptosi, che prevale sull'inefficace risposta proliferativa dei colangiociti (24).

Per il mantenimento di un'adeguata sopravvivenza dei colangiociti (23) non esiste una terapia efficace; i fattori che regolano l'equilibrio tra la proliferazione e la morte cellulare non sono ancora ben definiti. Le colangiopatie possono essere classificate a seconda del meccanismo patogenetico che ne è alla base in: disordini immunitari, di origine infettiva, disordini genetici, di origine tossica o farmaco indotta e infine, da cause vascolari (25).

La mancanza di una conoscenza fisiopatologica ritarda lo sviluppo di un'efficace terapia per le colangiopatie.

Fanno parte delle colangiopatie croniche di origine immunitaria, la cirrosi biliare primitiva (PBC) e la colangite sclerosante primitiva (PSC).

Nonostante le differenze eziologiche, le colangiopatie presentano patogenesi simile, con progressiva perdita dei dotti biliari, infiammazione, fibrosi, cirrosi e insufficienza epatica (26).

La PBC è una malattia immuno-mediata in cui nel 90% dei casi sono presenti anticorpi anti-mitochondriali (27); è caratterizzata da una progressiva perdita dei piccoli dotti biliari intraepatici, con aumentata infiammazione portale, progressiva colestasi, fibrosi e possibile evoluzione in cirrosi, e necessità di ricorrere al trapianto epatico (28).

La PSC è una malattia di origine multifattoriale, che colpisce prevalentemente uomini di età media, associata spesso a malattie croniche intestinali (29). In soggetti con predisposizione genetica, una causa scatenante, probabilmente di origine infettiva, attiverebbe la risposta immunitaria e sarebbe quindi alla base della sua insorgenza (30). Istologicamente è caratterizzata da perdita dei dotti biliari di medio-grande calibro intra/extraepatici con fibrosi e infiammazione, che si associa a severe complicanze tra cui l'insorgenza del colangiocarcinoma (31).

Criteri per diagnosticare la patologia, sono solitamente coliti ulcerose croniche (47), persistenti per più di 6 mesi, aumento dei livelli di fosfatasi alcalina sierica, più del doppio del limite della norma, stenosi biliare monitorata tramite colangiografia, e l'esclusione di colangite sclerosante secondaria (46,47).

Fattori genetici ed ambientali, sembrano contribuire alla patogenesi di PSC convalidati da studi sull'intero genoma, che hanno identificato 16 loci suscettibili che probabilmente contribuiscono alla patogenesi (48-50). La più importante regione predisponente alla malattia risiede nel locus HLA-B (49).

I dati suggeriscono che dopo un insulto ambientale non identificato, l'immunità innata e quella adattativa, in individui geneticamente predisposti contribuisce all'infiammazione cronica delle vie biliari, con aumento della tossicità intrinseca dei costituenti biliari (50). Inoltre, l'ingresso nell'intestino di un agente infettivo o di una componente microbica come l'LPS, e il raggiungimento nella circolazione portale può contribuire all'infiammazione biliare. Dati recenti suggeriscono che nella PSC, i colangiociti subiscono il fenomeno della senescenza cellulare, un fenotipo associato alla secrezione di varie citochine (52) che possono partecipare alla patogenesi della PSC (53).

Ad oggi, non esiste una terapia efficace per PSC, anche se studi clinici suggeriscono, che l'UDCA, analizzato sia in campioni di siero, che istologici ha riportato un miglioramento, senza un'aumentata sopravvivenza nei pazienti. Inoltre, la somministrazione di alte dosi in pazienti con PSC di UDCA, ha rivelato un rischio 2-3 volte maggiore di sviluppare cirrosi, varici, e colangiocarcinoma, con la necessità di un trapianto di fegato (54).

Sono necessari maggiori studi per poter esserci delle linee guida sull'utilizzo di UDCA come terapia. Il trapianto di fegato rimane la terapia d'elezione per pazienti con PSC avanzata, con una sopravvivenza nell'85% di un anno e nel 72% di cinque anni; con un 25% di pazienti che dopo il trapianto possono ripresentare la malattia

1.2 FUNZIONE DEI COLANGIOCITI

Gli epatociti, insieme ai colangiociti, partecipano insieme alla produzione della bile. I colangiociti, modificano la bile a livello canicolare, sia secernendo che assorbendo soluti da essa; nello specifico glucosio, amminoacidi e sali biliari vengono assorbiti grazie a specifici trasportatori localizzati nella loro membrana apicale.

La funzione secretoria dei colangiociti è quella di alcalinizzare la bile secernendo bicarbonato; una delle prime molecole scoperte essere un regolatore di tale meccanismo fu la secretina. Una cascata intracellulare viene attivata in seguito al legame della secretina col suo recettore che è localizzato nella membrana basolaterale, conducendo a livello apicale, prima all'apertura del canale del Cl^- , denominato Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR), e dopo allo scambio Cl/HCO_3^- , chiamato AE2, con rilascio di bile arricchita di bicarbonato (38). Recentemente, è stata postulata l'ipotesi che la secrezione della bile arricchita di bicarbonato possa proteggere l'epitelio biliare nei confronti dei sali biliari tossici, e che disfunzioni di tale sistema possano costituire un fattore predisponente per le colangiopatie croniche (85).

1.2.1 TRASFORMAZIONE NEUROENDOCRINA DEI COLANGIOCITI

I colangiociti, in risposta al danno, non solo proliferano, ma acquisiscono un fenotipo simil-neuroendocrino. Oltre ad esprimere i tipici markers delle cellule endocrine quali Cromogranina A, Glicolipide A2-B4, proteina S100 e Neural cell adhesion molecule, e presentare granuli neuroendocrini, producono fattori, che in condizioni di quiescenza non secernerebbero. Rispondono più intensamente ai segnali indotti da ormoni, che agiscono su di essi in condizioni fisiologiche (39).

Nel corso degli anni, sono state scoperte varie e numerose molecole fondamentali nella fisiopatologia dei colangiociti reattivi.

Tra gli ormoni, la secretina regola diverse funzioni cellulari, ed è stato infatti dimostrato, che il recettore è iperespresso in modelli animali di iperplasia biliare, quale BDL, con incremento della secrezione di bicarbonato nella bile (40,41).

La somatostatina svolge un'azione antiproliferativa, osservata sia *in vitro* che *in vivo* (20), in grado di ridurre proliferazione e fibrosi epatica indotta dalla BDL (42).

La gastrina presenta effetti simili alla somatostatina; somministrata cronicamente a ratti dopo BDL, è in grado di ridurre la proliferazione dei colangiociti (43). I colangiociti, inoltre producono fattori angiogenetici, quali il Vascular endothelial growth factor (VEGF) e regolano la loro proliferazione in modo autocrino, attivando i recettori VEGFR-2 e VEGFR-3; questo meccanismo è

accentuato in corso di danno colestatico come osservato in ratti sottoposti a BDL (44).

L'ormone Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) nel fegato è secreto sia dagli epatociti che dai colangiociti; l'azione di tale ormone nei colangiociti sembra essere importante per la loro sopravvivenza e per prevenire l'apoptosi (45).

In ultimo, la fisiologia dei colangiociti viene regolata, da una vasta gamma di peptidi, ormoni e neurotrasmettitori che possono essere prodotti da cellule vicine, e agire in modo paracrino, o prodotte dai colangiociti, che possono quindi modulare, la loro stessa fisiologia attivando o inibendo specifici segnali intracellulari.

1.3 L'INFLAMMOSOMA

L' inflammasoma è un complesso multiproteico di circa 700 kDa, responsabile dell'attivazione delle caspasi-1 e 5, in grado di determinare la secrezione delle citochine infiammatorie IL-1 β e IL-18.

L'inflammasoma, viene classificato in base alla presenza di proteine citoplasmatiche denominate, Nod Like Receptor (NLRP), che rappresentano le proteine centrali del complesso che costituisce l'inflammasoma.

La famiglia NLRP è composta da 14 membri, caratterizzati dalla presenza a livello ammino -terminale (N-terminale) di un dominio di pirina (PYD).

Questa struttura è presente in NLRP 2-14, mentre NLRP1 contiene in aggiunta un dominio, FIIND e uno CARD, in posizione carbossi-terminale (C-terminale).

Per quanto riguarda le funzioni svolte dalle proteine NLRP, i primi studi hanno messo in evidenza un possibile ruolo nell'apoptosi, in quanto NLRP1 è in grado di legare la caspasi-9 e APAF-1. Studi successivi hanno poi suggerito un possibile coinvolgimento nel controllo del pathway "nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells" (NF- κ B) (86), attualmente non è chiaro, il modo in cui vengano attivate le proteine NLRP, né la loro azione come inibitori.(87)

NLRP1 è conosciuta come CARD7, ed è stata la prima proteina della famiglia NLRP ad essere identificata sulla base dell'omologia di sequenza con l'apoptotic protease activating factor-1(APAF-1) (88; 89). NLRP1, è in grado di indurre apoptosi da un lato, attraverso un'associazione diretta con la caspasi-2 e la caspasi-9, o con un' associazione indiretta con APAF-1.

Dati recenti sull'mRNA di NLRP1, hanno messo in evidenza il ruolo cruciale di questa proteina nell'attivazione delle caspasi proinfiammatorie. Questa struttura molecolare, si rinviene a livello del cuore, del timo, del fegato, del rene, della milza, del polmone e nei linfociti del sangue periferico (87).

1.3.1 L'INFLAMOSOMA NLRP3

L'inflamosoma NLRP3 è una proteina che nell'uomo si trova localizzata sul braccio lungo del cromosoma 1, in grado di attivare la caspasi-1 e NF- κ B (86).

La sua espressione è limitata alle cellule immunitarie, e la sua importanza nell'infiammazione deriva dal fatto che mutazioni nel gene di NLRP3 sono associate a malattie autoimmuni.

Le proteine appartenenti a NLRP sono in grado di interagire con ASC attraverso interazioni tra pirine (PYD-PYD).

ASC, è una proteina di 22 kDa che contiene un dominio CARD C-terminale, ed uno PYD N-terminale.

Il dominio PYD di ASC, interagisce con il dominio PYD di diversi NLRP, mentre CARD recluta il dominio CARD della pro-caspasi-1. Tale legame è in grado di indurre il processamento e l'attivazione della pro-IL-1 β .

La proteina ASC insieme a NLRP1, alla caspasi-1 e 5 costituiscono l'inflamosoma NLRP1, mentre l'inflamosoma definito come NLRP 2-3 è costituito in aggiunta a NLRP2 o 3, della proteina ASC, della caspasi-1 e della proteina CARDINAL (nota anche come CARD8).

Quest'ultima, è una componente chiave dell'inflamosoma di NLRP3, poiché ha la stessa organizzazione strutturale della regione C-terminale di NLRP1 (dominio FIIND e CARD). Si è osservato, inoltre, come in alcuni tipi di cancro, la proteina CARDINAL sia overespressa (90).

L'inflamosoma, è una "piattaforma" molecolare che viene utilizzata per l'attivazione delle caspasi proinfiammatorie. L'associazione di NLRP ad ASC,

attraverso la via del dominio di pirina, seguita dal reclutamento attraverso CARD, della caspasi-1 e 5, determina l'attivazione di queste ultime con il conseguente taglio dei substrati per le citochine pro-infiammatorie IL-1 β e IL-18.

I diversi componenti che costituiscono l'inflammosoma si assemblano e funzionano a livello del citoplasma.

Similmente ai recettori "Toll-like", l'attivazione di questa struttura avviene attraverso il riconoscimento di PAMPs, tramite domini ripetuti ricchi in leucina (LRRs) delle proteine NLRP.

Il solo componente batterico ad oggi conosciuto, in grado di attivare l'inflammosoma NLRP3, è il muramil dipeptide (MDP), un prodotto di degradazione dei peptidoglicani della parete batterica.

Studi recenti indicano che l'inflammosoma definito come NLRP3, possa essere attivato da segnali endogeni, così come in associazione a stimoli patogeni (91,92).

E' noto come macrofagi stimolati con LPS, e successivamente trattati con alte dosi di ATP siano in grado di rilasciare la citochina IL-1 β (93).

Gli effetti dell'ATP sono mediati da un recettore ionotropico, P2X7, il quale una volta attivato è in grado di causare un rapido efflusso di ioni potassio a livello citoplasmatico, con conseguente permeabilizzazione della membrana plasmatica, che determinerebbe poi, l'attivazione della caspasi e dell'inflammosoma NLRP3.

1.4 LE CITOCINE

Le citochine sono una classe eterogenea di proteine secretorie di piccole dimensioni, prodotte dalle cellule di entrambi i compartimenti del sistema immunitario: quello innato (macrofagi, leucociti polimorfonucleati e cellule NK) e quello specifico (linfociti T e B).

Sono mediatori che agiscono come segnali inter-cellulari; vengono secreti in risposta agli antigeni e sono in grado di stimolare risposte diverse da parte delle cellule coinvolte nei processi immunitari e infiammatori.

Nella fase d'attivazione delle risposte immunitarie esse favoriscono la crescita e la differenziazione dei linfociti, mentre nella fase effettrice attivano cellule diverse, promuovendo così l'eliminazione di agenti microbici e di altri antigeni.

Alcune citochine, fungono inoltre, da stimolatori dello sviluppo di cellule emopoietiche; sono quindi molecole molto efficaci che possono causare cambiamenti nella proliferazione, differenziazione e migrazione cellulare.

Alla famiglia delle citochine appartengono: le interleuchine (IL), gli interferoni (IFN), i fattori stimolanti le colonie (CSF), i fattori di necrosi tumorale (TNF), i fattori di crescita e le chemochine.

Nonostante si tratti di una famiglia di molecole molto eterogenee, si possono identificare alcune caratteristiche comuni:

- la secrezione è un fenomeno di breve durata ed auto-limitato;
- ciascuna agisce su tipi cellulari diversi, pleiotropismo;
- l'azione delle citochine può essere locale o sistemica; possono agire, sulla cellula stessa che le ha prodotte, azione autocrina, oppure su cellule vicine

ne, azione paracrina, o ancora su cellule lontane, azione endocrina, utilizzando il sistema ematico come mezzo di trasporto.

1.4.1 FUNZIONI DELLE CITOCHINE

Le citochine in base alla funzione che svolgono possono essere suddivise in tre gruppi:

- Citochine che mediano e regolano l'immunità innata, prodotte in particolare da fagociti mononucleati.

Nelle infezioni da parte di batteri extracellulari, i macrofagi rispondono alle endotossine e ad altri prodotti batterici producendo TNF, IL-1 e chemiochine. Il TNF e l'IL-1 agiscono sull'endotelio vascolare in prossimità del sito infiammatorio inducendo l'espressione di molecole di adesione.

I macrofagi reagiscono inoltre, a microrganismi intracellulari ed extracellulari secernendo IL-12 che induce la produzione di IFN- γ da parte delle cellule "Natural Killer" e dei linfociti T.

- Citochine che regolano e mediano l'immunità specifica, prodotte principalmente dai linfociti T in risposta al riconoscimento di antigeni estranei. Alcune citochine reclutano, attivano e controllano cellule effettrici specializzate, come i fagociti mononucleati, contribuendo così all'eliminazione effettiva dell'antigene.
- Citochine che stimolano l'emopoiesi, prodotte da cellule stromali del midollo osseo, leucociti ed altri tipi di cellule. Le citochine che promuovono la

crescita e la differenziazione dei progenitori presenti nel midollo osseo sono chiamate “fattori stimolanti la formazione di colonie” (CSF).

1.4.2 RECETTORI DELLE CITOCINE

Le citochine, come gli ormoni di origine proteica, svolgono la loro attività legandosi, spesso con elevata affinità, a recettori specifici; anche quando la concentrazione delle citochine è bassa.

I recettori per le citochine constano di almeno due catene, i cui domini citoplasmatici sono in grado di legare JAK-chinasi (Janus Chinasi), proteine citosoliche con un dominio C-terminale ad attività chinasi.

Il legame con la citochina, fa dimerizzare i recettori e permette così alle JAK-chinasi di transattivarsi a vicenda, fosforilando anche il recettore. Nel citoplasma sono anche presenti le proteine STAT (trasduttori del segnale e fattori di trascrizione) che, a coppie, si legano al sito fosforilato del recettore e vengono fosforilate dalle JAK-chinasi. Una volta fosforilate, le STAT si staccano, dimerizzano, vanno nel nucleo e attivano la trascrizione di geni importanti per l'immunità adattativa.

1.4.3 INTERLEUCHINA 18

L'interleuchina 18 è anche nota come fattore di induzione dell'IFN- γ (interferon gamma inducing factor, IGIF) per la sua capacità di indurre in topi stimolati con l'LPS, la produzione di IFN- γ .

Il gene murino dell'IL-18 si trova sul cromosoma 9 e codifica 192 aminoacidi, mentre quello umano è localizzato sul cromosoma 11q22 e codifica 193 aminoacidi.

L'IL-18 viene sintetizzata come precursore biologicamente inattivo, la pro-IL-18, avente peso molecolare di 24 kDa. Il taglio proteolitico viene effettuato a livello del residuo aminoacidico Asp-36 da una serin-proteasi intracellulare, detta ICE (caspasi 1), che determina la trasformazione e conversione della citochina nella forma matura di peso molecolare di 18 kDa (94).

E' stata di recente identificata una serin-esterasi di 29 kDa, che taglia la pro-IL-18 producendo la forma attiva della proteina.

Ciò suggerisce che l'IL-18 possa essere attivata sia a livello intracellulare che extracellulare.

La caspasi-3, taglia sia il precursore, che la forma matura dell'IL-18 producendo forme biologicamente attive, della proteina (95; 96). La caspasi è quindi un potenziale "down-regolatore" dell'IL-18.

1.4.4 RISPOSTA CITOTOSSICA IL-18

I macrofagi producono IL-18, in risposta all'LPS e ad altri prodotti batterici, che stimolano la produzione di IFN- γ da parte di cellule NK e linfociti T.

La citochina, si comporta da induttore dell'immunità cellulo-mediata, lavorando in sinergia con l'IL-12, necessaria affinché l'IL-18 induca la produzione di IFN- γ ; solo quando il recettore è "up-regolato" tramite l'IL-12. L' IL18 agisce in sinergia con l'IL-12 per la differenziazione delle cellule Th1, mentre non ha alcun effetto sul differenziamento delle cellule Th2 e relativa produzione di citochine.

L'IL-18, è prodotta costitutivamente nella forma immatura, da cellule Antigen- Presenting Cell (APC), ma può anche essere attivata durante una risposta infiammatoria. L'attività proinfiammatoria della citochina è dovuta alla sua capacità di stimolare la produzione di citochine infiammatorie, chemiochine, ed è amplificata dalla capacità di indurre la produzione di IFN- γ , che a sua volta attiva i macrofagi.

L' IL-18 induce la sintesi di TNF- α da parte di cellule CD4⁺ e cellule NK, nonché la sintesi di IL-1 β . E' inoltre in grado di indurre la produzione di IL-6 da parte di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) attivate con l'LPS, e mostra proprietà chemioattrattive nei confronti delle cellule polimorfonucleate, stimolando anche la produzione dell'IL-18 stessa.

1.5 GIUNZIONI ADERENTI (TIGHT JUNCTIONS)

Numerosi processi biologici che coinvolgono lo sviluppo degli organismi pluricellulari, dipendono in buona parte da precisi e controllati meccanismi di adesione e comunicazione cellulare. Questi meccanismi, tramite la formazione di contatti cellula-cellula e cellula-matrice, portano alla formazione di strutture ordinate, come quella presente negli epiteli, che sono alla base della formazione e dell'organizzazione di tessuti e organi. Uno dei più importanti tipi di giunzione cellulare, presente sia negli invertebrati che nei vertebrati, è rappresentata dalle giunzioni aderenti.

Le giunzioni aderenti sono particolarmente abbondanti fra le cellule epiteliali, e nel muscolo cardiaco. Negli epiteli, le giunzioni aderenti possono percorrere l'intero perimetro della cellula con una disposizione "a cintura", prendendo il nome di fascia aderente, o distribuirsi a "moneta" in punti di piccola estensione, prendendo il nome di macula aderente o desmosoma.

1.5.1 STRUTTURA MOLECOLARE DELLA SUPER FAMIGLIA DELLE CADERINE

Le caderine, costituiscono una famiglia di glicoproteine di membrana, composte da un dominio extracellulare responsabile delle interazioni cellula-cellula, un dominio idrofobico transmembrana, e un dominio citoplasmatico che

prende contatto con il citoscheletro attraverso l'interazione con un complesso di β -catenina, α -catenina e vinculina.

Le caderine, giocano un ruolo chiave nelle interazioni cellula-cellula calcio dipendenti, ed inoltre sono implicate in una serie di vie di trasduzione del segnale che regolano attivamente la vita cellulare. La principale caratteristica dei membri della famiglia delle caderine sono uno o più domini extracellulari ripetuti leganti il calcio (EC). Il calcio è essenziale per la funzione adesiva delle caderine e per la loro protezione contro la digestione da parte delle proteasi; questo è dovuto al fatto che gli ioni calcio si legano a specifici residui in ogni dominio extracellulare, per garantirne il corretto ripiegamento, conferendo così rigidità al dominio stesso.

Inoltre, data l'importanza delle caderine, nell'adesione, nella polarità funzionale, e nei meccanismi di trasduzione del segnale, l'interruzione della funzione di queste proteine ha implicazioni significative in molte condizioni patologiche, incluso il cancro (97; 98).

1.5.2 E-CADERINA

L' E- caderina, è la principale caderina presente nelle fasce aderenti dei tessuti epiteliali. E' una glicoproteina a singolo passaggio transmembrana, che appartiene alla famiglia delle caderine classiche; media l'adesione cellulare in presenza di Calcio.

Le caderine, rivestono la superficie della cellula dotandola di cariche negative, mentre il Ca^{2+} funziona da "collante": con le 2 cariche positive, infatti, lo

ione si interpone fra 2 caderine presenti su cellule diverse e ne permette l'adesione. L'adesione promossa dalle caderine è un'adesione omotipica, o fra cellule uguali.

La E-caderina, si trova alterata in diversi tumori, se si considera che il 80-90% dei tumori originano dalle cellule epiteliali, considerando anche quelli derivanti da accumulo di mutazioni in alcuni geni diversi.

La E-caderina è una molecola che sembra anche avere un ruolo protettivo nel cancro, dal momento che la sua perdita è associata con la progressione tumorale e la formazione di metastasi in una serie di diversi tipi di cancro.

1.5.3 REGOLAZIONE DELLA E-CADERINA

L'integrità strutturale del complesso caderina-catenina è regolata dalle chinasi, le quali risultano spesso up-regolate durante lo sviluppo e nella carcinogenesi. Tre residui di serina nel dominio citoplasmatico dell'E-caderina vengono fosforilati dalla chinasi GSK3 β (glicogeno sintasi chinasi β) causando, un aumento dell'affinità e del numero di interazioni con la β -catenina. Se invece la fosforilazione avviene sui residui di tirosina della β -catenina, si ha la rottura del legame con la caderina. L'attività di queste chinasi è bilanciata da quella delle fosfatasi. La perdita di questa stabilità è correlata alla progressione e all'invasione tumorale.

1.6 PERMEABILITA' DELLA BARRIERA EPITELIALE

L'intestino è naturalmente permeabile al passaggio di molecole molto piccole, perché questo è il meccanismo che consente di assorbire i nutrienti vitali che vi transitano. Infatti, la regolazione della permeabilità intestinale è una delle funzioni di base delle cellule che rivestono la parete intestinale. Fattori diversi possono indurre le cellule intestinali a rilasciare zonulina, una proteina che può rompere le "giunzioni serrate" nel rivestimento intestinale.

Una volta che queste giunzioni vengono spezzate, si parla di un permeabilità della barriera epiteliale o intestinale. Quando un intestino è permeabile, sostanze come le tossine, i microbi, e altro, possono passare dall'intestino e attraverso il flusso ematico, spostarsi in tutto il corpo. Il sistema immunitario segnala questi "invasori" come patogeni e li attacca. La risposta immunitaria a questi invasori può apparire sotto forma di segni che indicano la presenza di una permeabilità intestinale.

1.6.1 LA ZONULINA

La zonulina, è una proteina che regola la permeabilità dell'intestino. Gli anticorpi contro la zonulina indicano che la normale regolazione delle giunture è compromessa.

La zonulina è una proteina che modula le giunzioni strette degli enterociti, le cellule che costituiscono la parete intestinale. Essa si lega a uno specifico

recettore dell'epitelio della superficie intestinale, e innesca una cascata di reazioni biochimiche che creano un disassemblamento delle cellule epiteliali, con un conseguente aumento della permeabilità intestinale.

Ciò, fa sì che alcune sostanze passino attraverso l'epitelio stesso, scatenando nel tessuto linfoide sottostante una serie di reazioni immunitarie.

La zonulina, probabilmente è liberata dall'epitelio intestinale come risposta al peptide della α -gliadina, con conseguente disassemblaggio dei complessi delle giunzioni strette.

Il rilascio di zonulina provoca l'apertura di giunzioni strette, e il passaggio della gliadina attraverso di esse, in soggetti con alterazioni del sistema della zonulina.

Dopo la deamidazione della transglutaminasi tissutale, i peptidi della gliadina si legano ai recettori Human Leukocyte Antigen (HLA) presenti sulla superficie delle APC.

I peptidi della gliadina sono poi presentati ai linfociti T, processo che è seguito da una risposta immunitaria, sia umorale che cellulo-mediata, in individui geneticamente predisposti.

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Come obiettivo dello studio si è valutato il ruolo dell'attivazione dell'inflammosoma in risposta al danno nei colangiociti, ponendosi alcune domande:

- l'inflammosoma NLRP3 è espresso nei colangiti in proliferazione?
- l'attivazione di NLRP3 porta alla secrezione di citochine pro-infiammatorie nei colangiociti?
- l'attivazione di NLRP3 influenza la risposta dei colangiociti al danno?
- l'NLRP3 influenza lo sviluppo e la progressione del danno al fegato in modelli sperimentali di colangite sclerosante?

3. MATERIALI E METODI

3.1 MATERIALI

La 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC) è stata acquistata da Sniff GmbH (Soest, Germany).

L'anticorpo anti-citocheratina-19 (Ck-19) (TROMA-III) è stato ottenuto dalla Developmental Studies Hybridoma Bank, sviluppato sotto il patronato della NICHD e mantenuto dalla University of Iowa, Department of Biological Sciences, 52242, USA.

I Normal Rat Cultured Cholangiocytes (NRC, una linea cellulare di colangiociti isolati da ratti normali) sono stati gentilmente forniti dal Prof. Gianfranco Alpini, Texas A & M University, Temple, TX, Stati Uniti d'America. I topi Nlrp3A350VneoR (Nlrp3^{-/-}) sono stati acquistati da Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME).

3.2 L'ESPRESSIONE DELL'INFLAMMOSOMA NLRP3 NEI COLANGIOCITI

I livelli di espressione dell'inflammasoma sono stati valutati mediante Real-time PCR nei colangiociti isolati sia da topi normali che da topi alimentati con lo 0,1% di DDC per 8 settimane come modello murino di colangite scler-

rosanti (55). È stato inoltre eseguito uno studio immunohistochimico per NLRP3 su sezioni di fegato di pazienti affetti da PSC (n=3) e pazienti sani come controllo (=3). La purificazione dei colangiociti da topi è stata eseguita con la purificazione immune-bead (56).

3.3 L'EFFETTO IN VITRO DELL'INFLAMMOSOMA NLRP3 ATTIVATO NEI COLANGIOCITI

In tutti gli esperimenti *in vitro* è stata utilizzata una linea cellulare di colangiociti di ratto normale non trasfettata (Normal rat cholangiocytes) (57).

Per testare la specificità dell'attivazione dell'inflammosoma, gli NRC sono stati esposti per 48 ore a short interfering (si)RNA specifici per NLRP3, o ai corrispondenti non-targeting (nt)RNA.

L'inflammosoma NLRP3 è stato attivato in coltura tramite incubazioni con LPS (200 ng/ml) per 24 ore, con successiva somministrazione di ATP (5 mM) per 1, 3, e 6 ore (58). I cambiamenti nei livelli di espressione dell'mRNA di NLRP3, IL-18, IL-6 e IL-1 β sono stati valutati tramite Real-time PCR.

Cambiamenti nella proliferazione cellulare sono stati valutati dalla misura dei livelli di PCNA e Ki67 nelle culture di colangiociti.

L'integrità della barriera epiteliale è stata studiata dall'analisi del Western blot per Zonulina-1 e E-caderina, come marcatori di cellule epiteliali coinvolti nelle funzioni della barriera epiteliale (59,60).

3.4 REAL-TIME PCR

L'RNA totale è stato estratto utilizzando come reagente il TRIzol® (Life Technologies Corporation, Woburn, MA) seguendo il protocollo della ditta.

1 µg di RNA totale è stato convertito in cDNA, usando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

I primer per real-time PCR sono stati disegnati con il software Oligo 6 facendo riferimento alla sequenza di mRNA, accedendo tramite Gene Bank; la specificità dei primer è stata confermata tramite BLAST analysis.

La Real-time PCR è stata eseguita utilizzando il Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) e come fluoroforo SYBR Green. Si è usata la Ciclofilina B (peptidylprolyl isomerase B) come mRNA del gene di riferimento per la normalizzazione. The Gene Expression Macro Genex sviluppata dalla BioRad (Milan, Italy) è stata usata per calcolare i valori della relative expression dai dati della real-time PCR.

3.5 IMMUNOBLOTTING

Dopo elettroforesi e trasferimento delle proteine, le membrane sono state incubate a 4°C con uno specifico anticorpo, seguito da una seconda incubazione con il corrispettivo anticorpo secondario. Le proteine sono state visualizzate tramite chemiluminescenza (ECL Plus Western Blotting Substrate, Pierce). L'intensità delle bande era determinata tramite scansione video

di densitometria usando il sistema di immagini Chemi Doc (UVP, LCC Upland CA).

3.6 ESPERIMENTI DI KNOCK-DOWN TRAMITE SI-RNA

Le sequenze specifiche di siRNAs (short interfering RNAs) diretti verso NLRP3 sono stati acquistati dalla Dharmacon (Epsom, UK). Le quattro sequenze senso antagonista dell'mRNA di NLRP3 (GenBankTM accession NM_001191642.1), sono: 50-CGUAGUAGCGGGACAACGA-30, 50-GA-GAAUAAGAGGACCCGUA-30, 50 GAGCAGGAUUGUGCCGUA-30, 50-UACAAGGACCCGUGCGCAU-30. Le NRC sono state trasfettate il giorno dopo la piastratura, ad una confluenza di circa il 30-40%, utilizzando il reagente INTERFER (PolyPlus transfection, Illkirch, France), come raccomandato dall'azienda.

10 nmol/L di siRNA sono stati trasfettati nel medium completo, dopo 12 ore è stato sostituito da terreno fresco. Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate per isolare l'RNA.

I livelli di trascritto di NLRP3, trasfettati nelle NRC sia con il siRNA non targeting o con il siRNA per NLRP3, sono analizzati tramite real-time PCR.

3.7 LA RISPOSTA DEI COLANGIOCITI IN VIVO AL DANNO IN ASSENZA DI NLRP3

Topi adulti di 8 settimane (WT), e NLRP3 knockout (NLRP3^{-/-}), 5 per gruppo, sono stati alimentati con una dieta 0.1% DDC per quattro settimane, un modello di colangite sclerosante come precedentemente riportato (55).

Cambiamenti nella proliferazione dei colangiociti sono determinati dalla differenza di misure nella massa biliare intraepatica tramite immunoistochimica quantitativa su sezioni di fegato per CK-19.

Per la determinazione della massa biliare intraepatica dall'analisi computerizzata, abbiamo calcolato la percentuale del volume del fegato occupata dai dotti, dal numero totale di punti oltre il tessuto epatico e il numero di punti sui dotti CK - 19 positivi (56).

La valutazione semi-quantitativa dell'integrità epiteliale è stata fatta tramite immunocolorazione per E - caderina, fissata in formalina, e sezioni di fegato fissati in paraffina. I protocolli di studio di animali sono stati eseguiti in conformità con le linee guida delle istituzioni locali.

3.8 ANALISI STATISTICA

I dati, sono espressi come media $\pm$ SD. E' calcolato l'intervallo di confidenza (95% Confidence Interval CI). Le differenze tra gruppi sono analizzate dall'analisi di varianza (ANOVA). Le differenze tra gruppi sono considerate significative con il valore p (p value) inferiore a 0,05.

4. RISULTATI

4.1 L'ESPRESSIONE DI NLRP3 NEI COLANGIOCITI REATTIVI

L'espressione dell'inflammosoma NLRP3 è aumentata in condizioni di colangite sclerosante primitiva.

I colangiociti isolati da topi wild type trattati per 8 settimane con la dieta DDC mostrano elevati livelli nell'espressione di NLRP3 rispetto a topi di controllo non trattati.

Sulla stessa linea, si evidenzia un aumento nell'espressione dell'mRNA di proteine adattatrici ASC, e di citochine proinfiammatorie, nello specifico, l'IL-1 β risulta aumentata nei colangiociti reattivi (Fig 1A).

Inoltre, l'espressione di NLRP3 è stata valutata tramite immunoistochimica, nelle sezioni di fegato di individui sani e di pazienti affetti da PSC.

Come mostrato nella Figura 1B, nessun segnale è stato rilevato nelle cellule biliari di fegato umano di controllo.

Al contrario, l'immunostaining di NLRP3 mostra un'espressione positiva nei colangiociti reattivi nel fegato di pazienti con PSC, suggerendo che l'attivazione dell'inflammosoma NLRP3 potrebbe giocare un ruolo importante nella patologia umana.

4.2 L'ATTIVAZIONE DI NLRP3 INDUCE L'ESPRESSIONE DI IL-18 E IL-6, NON DI IL-1 β

In vitro, incubazioni sequenziali con LPS e ATP determinano l'aumento dell'espressione di NLRP3 in colture di colangiociti (Fig 2A).

La stessa stimolazione, in colture di colangiociti, induce l'espressione delle citochine pro-infiammatorie, IL-18 e IL-6, con un aumento significativo dopo tre ore di incubazione con ATP, senza mostrare effetti sulla sintesi di IL-1 β (Figure 2B-D).

Per verificare che gli effetti della stimolazione con LPS/ATP fossero direttamente legati all'attivazione dell'inflammosoma, NLRP3 è stato silenziato da uno specifico siRNA.

Abbiamo raggiunto un livello di silenziamento dell'espressione di NLRP3 di circa l'80% in cellule non stimulate. Il knock-down di NLRP3 ha determinato inoltre una minor induzione dell'espressione di NLRP3 stesso in cellule stimulate con LPS/ATP (Figura 3A). Infine, il silenziamento di NLRP3 riduce l'aumento della sintesi di IL-18 nelle cellule incubate con LPS/ATP (Figure 3B-C).

4.3 IN VITRO L'ATTIVAZIONE DI NLRP3 NON MOSTRA EFFETTI SULLA PROLIFERAZIONE DEI COLANGIOCITI MA INFLUENZA LE FUNZIONI DELLA BARRIERA EPITELIALE

Per verificare se l'attivazione di NLRP3 influenza la proliferazione biliare, colture di colangiociti sono state incubate con LPS/ATP, e la proliferazione cellulare è stata valutata tramite Real-time PCR per PCNA e Ki67.

Come mostrato in Figura 4, l'incubazione con LPS/ATP non ha mostrato un effetto significativo sulla proliferazione di colture di colangiociti con entrambe le metodiche impiegate.

Tuttavia l'attivazione dell'inflammosoma NLRP3 riduce l'espressione dell'E-caderina e della Zonulina-1, entrambi markers di cellule epiteliali e coinvolti nelle funzioni della barriera epiteliale, rispetto alle cellule di controllo (Figura 5A).

Per confermare che l'effetto dell'incubazione con LPS/ATP fosse mediato dall'attivazione dell'inflammosoma, l'esperimento è stato ripetuto in assenza o presenza di uno specifico siRNA agonista di NLRP3.

Come mostrato in Figura 5B il silenziamento di NLRP3 neutralizza la diminuzione dell'espressione di Zonulina-1 e dell'E-caderina indotta dalla stimolazione con LPS/ATP indicando il coinvolgimento dell'attivazione di NLRP3 nell'integrità epiteliale *in vitro*.

4.4 NLRP3 REGOLA LA PROLIFERAZIONE DEI COLANGIOCITI IN UN MODELLO MURINO DI COLAGIOCITE SCLEROSANTE

Per studiare l'attivazione di NLRP3 in un modello *in vivo* di colangite sclerosante, topi WT e NLRP3^{-/-} sono stati alimentati per 4 settimane con la dieta DDC.

L'aumento della massa dei dotti biliari, in topi NLRP3^{-/-} alimentati per 4 settimane con DDC si è mostrato significativamente ridotto, tramite valutazioni con immunoistochimica quantitativa marcata con CK-19, rispetto ai topi di controllo (Figura 6A).

Per supportare i dati *in vitro*, che mostrano una ridotta espressione di molecole di adesione cellulare, l'espressione dell'E-caderina è stata valutata mediante immunoistochimica semiquantitativa.

Come mostrato in Figura 6, l'espressione dell'E-caderina tende ad aumentare in topi NLRP3^{-/-} sottoposti a DDC, rispetto ai topi di controllo.

5. CONCLUSIONI

L'NLRP3 è espresso in colangiociti reattivi , e in pazienti con PSC.

L'attivazione di NLRP3 nei colangiociti determina la sintesi di citochine pro-infiammatorie ed influenza l'integrità epiteliale dei colangiociti. Questi risultati suggeriscono che prodotti microbici possono influire sullo sviluppo della colangiopatie mediante l'attivazione dell'inflammosoma e la conseguente alterazione della barriera epiteliale formata dai colangiociti.

6. DISCUSSIONE

Nel presente studio, abbiamo dimostrato che NLRP3 è sovra-espresso nei colangiociti reattivi, sia in un modello murino di colangite sclerosante sia nei colangiti di pazienti affetti da PSC. Inoltre, l'attivazione dell'inflammosoma NLRP3 nei colangiociti induce la sintesi di citochine pro-infiammatorie ed altera la permeabilità dell'epitelio biliare.

Nel presente studio abbiamo dimostrato che l'attivazione di NLRP3 nei colangiociti influenza le funzioni della barriera epiteliale, ma non ha effetti sulla proliferazione biliare. *In vivo*, topi knock-out per l'espressione di Nlrp3 mostrano una ridotta proliferazione dei colangiociti in risposta al danno; tale effetto sembra verosimilmente legato alla mancata alterazione della permeabilità dell'epitelio biliare nei topi Nlrp3^{-/-}.

Benché ritenuto sterile in condizioni normali, il tratto biliare è frequentemente esposto a microrganismi e ad una varietà di prodotti batterici conosciuti come PAMPs. Inoltre, la circolazione portale fornisce agli epatociti una considerevole quantità di PAMPs di derivazione intestinale come l'LPS, che raggiunge la bile nella sua forma bioattiva (4,64). I batteri possono colonizzare i dotti biliari per la continuità con il duodeno, raramente, possono causare infezioni dei colangiociti e dell'albero biliare (62,63). Il ruolo dei PAMPs sulla fisiopatologia dei colangiociti reattivi nel corso delle malattie colestatiche croniche quali la PSC rimane tuttavia da valutare.

E' interessante evidenziare che, quando compaiono condizioni colestatiche in pazienti con PSC, i colangiociti accumulano quantità anomale di LPS (6).

Molti studi hanno dimostrato che la stimolazione dei colangiociti con LPS attiva una varietà di pathway molecolari coinvolti nella sintesi di citochine, proliferazione biliare e sopravvivenza cellulare (65,66).

Gli effetti dell'attivazione dell'immunità innata nei colangiociti sono particolarmente interessanti nei pazienti affetti da PSC data la forte associazione con le malattie infiammatorie croniche dell'intestino (IBD).

Un aumento della permeabilità intestinale o una particolare suscettibilità genetica a prodotti batterici nei pazienti affetti da PSC-IBD forma le basi della cosiddetta "leaky gut hypothesis", formulata per spiegare la patogenesi della PSC (67). È interessante notare a questo proposito che il trattamento combinato con l'UDCA e con l'antibiotico metronidazolo si è dimostrato più efficace dell'UDCA da solo nel ridurre i livelli di fosfatasi alcalina e il New Mayo Risk Score nei pazienti con PSC (68).

Insieme ad una vasta varietà di recettori di riconoscimento per i patogeni come i recettori toll-like (TLRs) (5), abbiamo dimostrato che i colangiociti reattivi esprimono, come descritto in precedenza, recettori per la famiglia NOD-like (NLR), con il dominio pirina che contiene la proteina 3 dell'inflammosoma NLRP3 (Figura 1).

L'NLRP3 è un sensore citosolico che viene attivato da insulti di vari genere, originati sia da stimoli esogeni che endogeni (69). Al momento dell'attivazione, unità di NLRP3 oligomerizzano e formano il complesso dell'inflammosoma con proteine speck-like associate all'apoptosi contenente una CARD (ASC), che a sua volta si lega e attiva la caspasi-1 (6,70).

Come è stato dimostrato in una varietà di tessuti, compresi il fegato, il risultato finale dell'attivazione di NLRP3 è la sintesi di citochine proinfiammatorie come IL-1 β e IL-18 (71,72).

Come modello di colangite sclerosante primitiva, si sono utilizzati colangiociti reattivi, isolati da topi sottoposti a trattamento con DDC per 8 settimane, in cui i componenti dell'inflammosoma come ASC e IL-1 β sono up regolati (Figura 1A). Inoltre, mentre negli individui sani l'espressione dell'inflammosoma non è stata rilevata nelle cellule biliari, nei colangiociti di pazienti con PSC si è mostrato un immunostaining positivo per NLRP3, indicando un up-regolazione del pathway in questa patologia (Figura 1B).

Per verificare che l'attivazione dell'inflammosoma ha un ruolo funzionale nelle cellule biliari, abbiamo stimolato colture di colangiociti con incubazioni sequenziali di LPS e ATP (58). Sono necessari due segnali per attivare l'inflammosoma NLRP3 e rilasciare l'IL-1 β ; il primo determina l'espressione di forme immature di citochine pro-infiammatorie, il secondo, assembla e induce il rilascio della caspasi-1 e di citochine mature.

Incubazioni sequenziali con LPS/ATP portano ad un aumento dell'espressione di NLRP3, di IL-18 e IL-6 (Figura 2A-C), citochine pro-infiammatorie ma non mostrano alcun effetto di attivazione e sintesi di IL-1 β (Figura 2D).

Il silenziamento dell'espressione di NLRP3 determina una significativa riduzione dell'espressione dell'IL-18, indicando la specificità dell'incubazione con LPS/ATP sul pathway dell'inflammosoma (Figura P3).

La proliferazione è un aspetto essenziale della reazione biliare al danno. La proliferazione dei colangiociti è importante dal punto di vista funzionale per il mantenimento della massa biliare, e quindi per le funzioni secretorie asso-

ciate all'epitelio biliare. Tuttavia, quando prevalgono i processi apoptotici si sviluppa duttopenia, con costante infiammazione, che si pensi stimoli lo sviluppo del colangiocarcinoma.

In vitro, l'attivazione dell'inflammosoma NLRP3 non ha mostrato alcun effetto sulla proliferazione biliare, valutata con l'espressione di marker specifici di proliferazione PCNA e Ki-67 (Figura 4).

Il ruolo diretto dell'attivazione di NLRP3 nella proliferazione cellulare fisiologica e neoplastica rimane ancora da chiarire (73). Nelle patologie epatobiliari, nonostante si ritenga comunemente che l'infiammazione cronica contribuisca alla degenerazione neoplastica della proliferazione cellulare rigenerativa, un recente report ha chiaramente dimostrato che l'espressione di NLRP3 è down-regolata nel carcinoma epatocellulare umano (HCC) e correla con lo stadio avanzato della malattia, suggerendo un ruolo protettivo dell'inflammosma NLRP3 sulla proliferazione epatocellulare (74).

Abbiamo dimostrato che l'attivazione di NLRP3 nei colangiociti ha, tuttavia, importanti effetti sulle molecole di adesione cellulare coinvolte nelle funzioni di barriera delle cellule epiteliali. L'incubazione con LPS/ATP nei colangiociti in coltura era effettivamente in grado di ridurre in maniera significativa l'espressione delle proteine E-caderina e Zonulina-1 (Figura 5A).

Inoltre, la specificità di questi risultati è stata valutata nei colangiociti knock-down per l'espressione di NLRP3, che annulla completamente gli effetti di LPS/ATP (Figura 5B).

La diminuzione dei livelli di espressione delle proteine E-caderina e Zonulina-1 è correlata con l'aumento della permeabilità epiteliale in vari tessuti (75,76). Si è visto che un malfunzionamento della barriera epiteliale nei co-

langiociti di topo gioca un ruolo essenziale sullo sviluppo di lesioni biliari, e si ritiene che possa contribuire all'insorgere, nell'uomo, della PSC (77). Infatti, citochine pro-infiammatorie e PAMPs, possono alterare la permeabilità dei colangiociti, in assenza o presenza di modifiche strutturali, delle molecole di adesione cellulare (78,79). La rottura dell'integrità epiteliale dei colangiociti nel topo MDR2^{-/-}, un recente modello murino di PSC, causa la fuoriuscita dei costituenti biliari dai dotti, determinando fibrosi e infiammazione portale (80).

Nel presente lavoro, dimostriamo che l'attivazione dell'inflammosoma NLRP3 mediato da PAMPs compromette le funzionalità della barriera epiteliale dei colangiociti *in vitro*, sostenendo il concetto che i prodotti microbici possono influenzare funzionalmente le cellule biliari e predisporre allo sviluppo di colangiopatie.

Nell'ultima parte dello studio, per valutare se l'attivazione di NLRP3 avesse un ruolo significativo nella risposta dei colangiociti al danno, topi *Nlrp3*^{-/-} sono stati sottoposti ad una dieta con DDC per 4 settimane, e confrontati con topi wild-type. La proliferazione biliare è stata valutata mediante immunostochimica quantitativa per Ck-19, ed è risultata significativamente ridotta nei topi *Nlrp3*^{-/-}, rispetto ai topi di controllo (Figura 6A).

E' interessante notare la ridotta proliferazione biliari in topi *Nlrp3*^{-/-} sottoposti a dieta con DDC rispetto ai topi wild-type, considerando che abbiamo dimostrato *in vitro* che l'attivazione dell'inflammosoma NLRP3 compromette l'integrità della barriera epiteliale nei colangiociti. Tale effetto potrebbe essere dovuto al ripristino della barriera epiteliale nei topi *Nlrp3*^{-/-}, con meno

permeabilità dei componenti biliari tossici e quindi un'inflammatione meno severa.

In linea con gli esperimenti *in vitro*, saggi di immunoistochimica dimostrano che l'espressione dell'E-caderina tende ad essere maggiore nei dotti biliari di Nlrp3^{-/-}, rispetto ai WT (Figura 6B), trattati entrambi con DDC.

I nostri dati rappresentano la prima dimostrazione che l'inflammosoma NLRP3 è espresso nei colangiociti reattivi, sia in modelli murini di colangite sclerosante che nei pazienti con PSC.

Abbiamo dimostrato che l'attivazione di NLRP3 è in grado di influenzare la risposta fisiologica dei colangiociti al danno, e può quindi rappresentare un potenziale target per trattare le colangiopatie come la PSC.

Inibitori selettivi dell'inflammosoma NLRP3 sono attualmente in corso di sperimentazione e hanno mostrato risultati preliminari promettenti sia *in vitro* che *in vivo* (81,82). E' necessario altro tempo per chiarire il potenziale ruolo di inibizione di NLRP3 nel corso di PSC.

Il nostro studio offre tuttavia interessanti spunti di riflessione sull'interazione funzionale dell'epitelio biliare e l'inflammosoma NLRP3.

L'inibizione di NLRP3 in cellule biliari può ripristinare o migliorare l'integrità dell'epitelio colangiocellulare, determinando meno permeabilità agli acidi biliari, con una ridotta infiammazione. La tossicità diretta o indiretta di acidi biliari è collegata allo sviluppo di colangiopatie, secondo la cosiddetta "toxic bile acid hypothesis" (83,84).

In conclusione, abbiamo dimostrato che l'attivazione dell'inflammosoma NLRP3, stimolata da prodotti microbici, induce la sintesi di citochine pro-infiammatorie e interrompe la funzione della barriera epiteliale dei colangiociti.

In vivo, la proliferazione biliare in risposta al danno risulta ridotta in topi knock-down per Nlrp3.

I nostri dati suggeriscono che i prodotti batterici possono attivare l'inflammosoma NLRP3 nei colangiociti, e influenzare lo sviluppo di colangiopatie.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Lumsden AB, Henderson JM, Kutner MH. Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1988;8:232-236.
2. Mimura Y, Sakisaka S, Harada M, Sata M, Tanikawa K. Role of hepatocytes in direct clearance of lipopolysaccharide in rats. *Gastroenterology* 1995;109:1969-1976.
3. Sasatomi K, Noguchi K, Sakisaka S, Sata M, Tanikawa K. Abnormal accumulation of endotoxin in biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 1998;29:409-416.
4. Lumsden AB, Henderson JM, Kutner MH. Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1988;8:232-236.
5. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol* 2010;10:210-215.
6. Chen XM, O'Hara SP, LaRusso NF. The immunobiology of cholangiocytes. *Immunol Cell Biol* 2008;86:497-505.
7. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol* 2011;29:707-735.
8. Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alvaro D, Alpini G. Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology* 2000;31:555-561.

9. Marzioni M, Glaser SS, Francis H, Phinizy JL, LeSage G, Alpini G. Functional heterogeneity of cholangiocytes. *Semin Liver Dis* 2002;22:227-240.
10. Alpini G, Glaser S, Robertson W, Rodgers RE, Phinizy JL, Lasater J, LeSage GD. Large but not small intrahepatic bile ducts are involved in secretin-regulated ductal bile secretion. *Am J Physiol* 1997;272:G1064-1074.
11. Ludwig J. New concepts in biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 1987;7:293-301.
12. Alpini, G., et al., Large but not small intrahepatic bile ducts are involved in secretin-regulated ductal bile secretion. *The American journal of physiology*, 1997. 272(5 Pt 1): p. G1064-74.
13. Alpini, G., et al., Functional expression of the apical Na⁺-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes. *Gastroenterology*, 1997. 113(5): p. 1734-40.
14. Gaudio, E., et al., Cholangiocytes and blood supply. *World journal of gastroenterology : WJG*, 2006. 12(22): p. 3546-52.
15. Haratake, J., et al., Morphological changes of hepatic microcirculation in experimental rat cirrhosis: a scanning electron microscopic study. *Hepatology*, 1991. 13(5): p. 952-6.
16. Glaser, S., et al., Heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *World journal of gastroenterology : WJG*, 2006. 12(22): p. 3523-36.
17. Banales, J.M., J. Prieto, and J.F. Medina, Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. *World journal of gastroenterology : WJG*, 2006. 12(22): p. 3496-511.

- 18.** Baiocchi, L., et al., Regulation of cholangiocyte bile secretion. *Journal of hepatology*, 1999. 31(1): p. 179-91.
- 19.** Glaser, S.S., et al., Gastrin inhibits secretin-induced ductal secretion by interaction with specific receptors on rat cholangiocytes. *The American journal of physiology*, 1997. 273(5 Pt 1): p. G1061-70.
- 20.** Tietz, P.S., et al., Somatostatin inhibits secretin-induced ductal hypercholeresis and exocytosis by cholangiocytes. *The American journal of physiology*, 1995. 269(1 Pt 1): p. G110-8.
- 21.** Lesage, G.D., et al., Insulin inhibits secretin-induced ductal secretion by activation of PKC alpha and inhibition of PKA activity. *Hepatology*, 2002. 36(3): p. 641-51.
- 22.** Spirli, C., et al., Proinflammatory cytokines inhibit secretion in rat bile duct epithelium. *Gastroenterology*, 2001. 121(1): p. 156-69.
- 23.** Marzioni, M., et al., Functional heterogeneity of cholangiocytes. *Seminars in liver disease*, 2002. 22(3): p. 227-40.
- 24.** Carpenter, H.A., Bacterial and parasitic cholangitis. *Mayo Clinic proceedings*. Mayo Clinic, 1998. 73(5): p. 473-8.
- 25.** Tietz PS, Alpini G, Pham LD, Larusso NF. Somatostatin inhibits secretin-induced ductal hypercholeresis and exocytosis by cholangiocytes. *Am J Physiol* 1995;269:G110-118.
- 26.** Alpini G, Lenzi R, Sarkozi L, Tavoloni N. Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules. *J Clin Invest* 1988;81:569-578.

- 27.** Nguyen, D.L., B.D. Juran, and K.N. Lazaridis, Primary biliary cirrhosis. Best practice & research. Clinical gastroenterology, 2010. 24(5): p. 647-54.
- 28.** Hohenester, S., R.P. Oude-Elferink, and U. Beuers, Primary biliary cirrhosis. Seminars in immunopathology, 2009. 31(3): p. 283-307.
- 29.** Weismuller, T.J., et al., The challenges in primary sclerosing cholangitis--aetiopathogenesis, autoimmunity, management and malignancy. Journal of hepatology, 2008. 48 Suppl 1: p. S38-57.
- 30.** Pollheimer, M.J., et al., Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis. Best practice & research. Clinical gastroenterology, 2011. 25(6): p. 727-39.
- 31.** Silveira, M.G. and K.D. Lindor, Primary sclerosing cholangitis. Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie, 2008. 22(8): p. 689-98.
- 32.** Alpini G, Ulrich C, Roberts S, Phillips JO, Ueno Y, Podila PV, Colegio O, et al. Molecular and functional heterogeneity of cholangiocytes from rat liver after bile duct ligation. Am J Physiol 1997;272:G289-297.
- 33.** Alpini G, Glaser S, Robertson W, Phinzy JL, Rodgers RE, Caligiuri A, LeSage G. Bile acids stimulate proliferative and secretory events in large but not small cholangiocytes. Am J Physiol 1997;273:G518-529.
- 34.** Alpini G, Glaser SS, Rodgers R, Phinzy JL, Robertson WE, Lasater J, Caligiuri A, et al. Functional expression of the apical Na⁺-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes. Gastroenterology 1997;113:1734-1740.

- 35.** LeSage GD, Glaser SS, Marucci L, Benedetti A, Phinizy JL, Rodgers R, Caligiuri A, et al. Acute carbon tetrachloride feeding induces damage of large but not small cholangiocytes from BDL rat liver. *Am J Physiol* 1999;276:G1289-1301.
- 36.** LeSage GD, Benedetti A, Glaser S, Marucci L, Tretjak Z, Caligiuri A, Rodgers R, et al. Acute carbon tetrachloride feeding selectively damages large, but not small, cholangiocytes from normal rat liver. *Hepatology* 1999;29:307-319.
- 37.** Benedetti A, Bassotti C, Rapino K, Marucci L, Jezequel AM. A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *J Hepatol* 1996;24:335-342.
- 38.** Alpini G, McGill JM, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Hematology* 2002;35:1256-1268.
- 39.** Alvaro, D., et al., Proliferating cholangiocytes: a neuroendocrine compartment in the diseased liver. *Gastroenterology*, 2007. 132(1): p. 415-31.
- 40.** Jensen, K., et al., Autocrine regulation of biliary pathology by activated cholangiocytes. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 2012. 302(5): p. G473-83.
- 41.** Alpini, G., et al., Upregulation of secretin receptor gene expression in rat cholangiocytes after bile duct ligation. *The American journal of physiology*, 1994. 266(5 Pt 1): p. G922-8.
- 42.** Tracy, T.F., Jr., et al., Somatostatin analogue (octreotide) inhibits bile duct epithelial cell proliferation and fibrosis after extrahepatic biliary obstruction. *The American journal of pathology*, 1993. 143(6): p. 1574-8.

43. Glaser, S., et al., Gastrin inhibits cholangiocyte growth in bile ductligated rats by interaction with cholecystokinin-B/Gastrin receptors via D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate-, $\text{Ca}(2+)$ -, and protein kinase C alpha-dependent mechanisms. *Hepatology*, 2000. 32(1): p. 17-25.
44. Gaudio, E., et al., Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology*, 2006. 130(4): p. 1270-82.
45. Marzioni, M., et al., Autocrine/paracrine regulation of the growth of the biliary tree by the neuroendocrine hormone serotonin. *Gastroenterology*, 2005. 128(1): p. 121-37.
46. Eaton, J.E., Talwalkar, J.A., Lazaridis, K.N., Gores, G.J., and Lindor, K.D. Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management. *Gastroenterology*. 2013; 145: 521–536.
47. Chapman, R., Fevery, J., Kalloo, A. et al. Diagnosis and management of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology*. 2010; 51: 660–678.
48. Karlsen, T.H., Franke, A., Melum, E. et al. Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis. *Gastroenterology*. 2010; 138: 1102–1111.
49. Melum, E., Franke, A., Schramm, C. et al. Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis identifies two non-HLA susceptibility loci. *Nat Genet*. 2011; 43: 17–19.
50. Liu, J.Z., Hov, J.R., Folseraas, T. et al. Dense genotyping of immune-related disease regions identifies nine new risk loci for primary sclerosing cholangitis. *Nat Genet*. 2013; 45: 670–675.

- 51.** Rausch, P., Rehman, A., Kunzel, S. et al. Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 19030–19035.
- 52.** Rodier, F., Coppe, J.P., Patil, C.K. et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol.* 2009; 11: 973–979.
- 53.** Tabibian, J.H., O'Hara, S.P., Splinter, P.L., Trussoni, C.E., and LaRusso, N.F. Cholangiocyte senescence by way of N-ras activation is a characteristic of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology.* 2014; 59: 2263–2275.
- 54.** Lindor, K.D., Kowdley, K.V., Luketic, V.A. et al. High-dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary sclerosing cholangitis. *Hepatology.* 2009; 50: 808–814.
- 55.** Fickert P, Stoger U, Fuchsbichler A, Moustafa T, Marschall HU, Weiglein AH, Tsybrovskyy O, et al. A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. *Am J Pathol* 2007;171:525-536.
- 56.** Marzioni M, Saccomanno S, Agostinelli L, Rychlicki C, De Minicis S, Pierantonelli I, Trauner M, et al. PDX-1/Hes-1 interactions determine cholangiocyte proliferative response to injury in rodents: possible implications for sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2013;58:750-756.
- 57.** Salter KD, Roman RM, LaRusso NR, Fitz JG, Doctor RB. Modified culture conditions enhance expression of differentiated phenotypic properties of normal rat cholangiocytes. *Lab Invest* 2000;80:1775-1778.
- 58.** Mao K, Chen S, Chen M, Ma Y, Wang Y, Huang B, He Z, et al. Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. *Cell Res* 2013;23:201-212.

- 59.** Fanning AS, Anderson JM. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165:113-120.
- 60.** Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, Zhao Y, et al. E-cadherin/beta-catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:567305.
- 61.** Kaya M, Bestas R, Bacalan F, Bacaksiz F, Arslan EG, Kaplan MA. Microbial profile and antibiotic sensitivity pattern in bile cultures from endoscopic retrograde cholangiography patients. *World J Gastroenterol* 2012;18:3585-3589.
- 62.** Rosch T, Triptrap A, Born P, Ott R, Weigert N, Frimberger E, Allescher HD, et al. Bacteriobilia in percutaneous transhepatic biliary drainage: occurrence over time and clinical sequelae. A prospective observational study. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:1162-1168.
- 63.** Osnes T, Sandstad O, Skar V, Osnes M. Lipopolysaccharides and beta-glucuronidase activity in choledochal bile in relation to choledocholithiasis. *Digestion* 1997;58:437-443.
- 64.** Yokoyama T, Komori A, Nakamura M, Takii Y, Kamihira T, Shimoda S, Mori T, et al. Human intrahepatic biliary epithelial cells function in innate immunity by producing IL-6 and IL-8 via the TLR4-NF-kappaB and -MAPK signaling pathways. *Liver Int* 2006;26:467-476.
- 65.** Trussoni CE, Tabibian JH, Splinter PL, O'Hara SP. Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Biliary Epithelial Cell NRas Activation Requires Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). *PLoS One* 2015;10:e0125793.

- 66.** Tabibian JH, Talwalkar JA, Lindor KD. Role of the microbiota and antibiotics in primary sclerosing cholangitis. *Biomed Res Int* 2013;2013:389537.
- 67.** Farkkila M, Karvonen AL, Nurmi H, Nuutinen H, Taavitsainen M, Pikkarainen P, Karkkainen P. Metronidazole and ursodeoxycholic acid for primary sclerosing cholangitis: a randomized placebo-controlled trial. *Hepatology* 2004;40:1379-1386.
- 68.** Wen H, Miao EA, Ting JP. Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation. *Immunity* 2013;39:432-441.
- 69.** Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007;7:31-40.
- 70.** Szabo G, Csak T. Inflammasomes in liver diseases. *J Hepatol* 2012;57:642-654.
- 71.** Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, Hoffman HM, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology* 2014;59:898-910.
- 72.** Franchitto A, Onori P, Renzi A, Carpino G, Mancinelli R, Alvaro D, Gaudio E. Recent advances on the mechanisms regulating cholangiocyte proliferation and the significance of the neuroendocrine regulation of cholangiocyte pathophysiology. *Ann Transl Med* 2013;1:27.
- 73.** Kolb R, Liu GH, Janowski AM, Sutterwala FS, Zhang W. Inflammasomes in cancer: a double-edged sword. *Protein Cell* 2014;5:12-20.

- 74.** Wei Q, Mu K, Li T, Zhang Y, Yang Z, Jia X, Zhao W, et al. Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression. *Lab Invest* 2014;94:52-62.
- 75.** Wilcz-Villega EM, McClean S, O'Sullivan MA. Mast cell tryptase reduces junctional adhesion molecule-A (JAM-A) expression in intestinal epithelial cells: implications for the mechanisms of barrier dysfunction in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2013;108:1140-1151.
- 76.** Goto Y, Uchida Y, Nomura A, Sakamoto T, Ishii Y, Morishima Y, Masuyama K, et al. Dislocation of E-cadherin in the airway epithelium during an antigen-induced asthmatic response. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:712-718.
- 77.** Eaton JE, Talwalkar JA, Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management. *Gastroenterology* 2013;145:521-536.
- 78.** Hanada S, Harada M, Koga H, Kawaguchi T, Taniguchi E, Kumashiro R, Ueno T, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma directly impair epithelial barrier function in cultured mouse cholangiocytes. *Liver Int* 2003;23:3-11.
- 79.** Sheth P, Delos Santos N, Seth A, LaRusso NF, Rao RK. Lipopolysaccharide disrupts tight junctions in cholangiocyte monolayers by a c-Src-, TLR4-, and LBP-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:G308-318.
- 80.** Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, Zollner G, Kaser A, Tilg H, Krause R, et al. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes

sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* 2004;127:261-274.

81. Coll RC, Robertson AA, Chae JJ, Higgins SC, Munoz-Planillo R, In-serra MC, Vetter I, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med* 2015;21:248-255.

82. Marchetti C, Chojnacki J, Toldo S, Mezzaroma E, Tranchida N, Rose SW, Federici M, et al. A novel pharmacologic inhibitor of the NLRP3 inflammasome limits myocardial injury after ischemia-reperfusion in the mouse. *J Cardiovasc Pharmacol* 2014;63:316-322.

83. Chazouilleres O. Primary sclerosing cholangitis and bile acids. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012;36 Suppl 1:S21-25.

84. Trauner M, Fickert P, Halilbasic E, Moustafa T. Lessons from the toxic bile concept for the pathogenesis and treatment of cholestatic liver diseases. *Wien Med Wochenschr* 2008;158:542-548.

85. Hohenester, S., et al., A biliary HCO₃⁻ umbrella constitutes a protective mechanism against bile acid-induced injury in human cholangiocytes. *Hepatology*, 2012. 55(1): p. 173-83.

86. PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like Protein That Assembles with ASC and Regulates Activation of NF-κB. Received for publication, September 26, 2001, and in revised form, December 20, 2001 Published, JBC Papers in Press, January 10, 2002, DOI 10.1074/jbc.M112208200 Gulam A. Manji , Lin Wang‡, Brad J. Geddes, Melissa Brown, Sarah Merriam, Amal

Al-Garawi, Simona Mak, Jose M. Lora, Michael Briskin, Mark Jurman, Jie Cao, Peter S. DiStefano, and John Bertin.

- 87.** Fiorentino L, Stehlik C, Oliveira V, Ariza ME, Godzik A, Reed JC (2002). A novel PAAD-containing protein that modulates NF-kappa B induction by cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta. *J Biol Chem* 277, 35333-35340.
- 88.** Molecular Cloning and Characterization of DEFCAP-L and -S, Two Isoforms of a Novel Member of the Mammalian Ced-4 Family of Apoptosis Proteins*. Tommy Hlaing, Ren-Feng Guo, Kari A. Dilley, Jennifer M. Loussia, Tammy A. Morrish, Michael M. Shi, Claudius Vincenz and Peter A. Ward. First Published on November 13, 2000, doi:10.1074/jbc.M009853200 March 23, 2001 *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 9230-9238.
- 89.** Chu Z, Pio F, Xie Z, Welsh K, Krajewska M, Krajewski S, Godzik A, Reed JC (2001). A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c-dependent caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* 276, 9239-9245.
- 90.** CARD-8 Protein, a New CARD Family Member That Regulates Caspase-1 Activation and Apoptosis. Marjaneh Razmara, Srinivasa M. Srinivasula, Jean-Luc Poyet, Brad J. Geddes, Peter S. DiStefano, John Bertin and Emad S. Alnemri doi:10.1074/jbc.M107811200 April 19, 2002 *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 13952-13958.
- 91.** Kanneganti TD, Özören N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A,

Grant EP, Akira S, Núñez G (2006). Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440, 233-236.

92. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228-232.

93. Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F (2006). The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol* 176, 3877-3883.

94. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Hishigashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS (1997). Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 275, 206-209.

95. Fantuzzi G, Puren AJ, Harding MW, Livingstone DJ, Dinarello CA (1998). Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice. *Blood* 91, 2118-2125.

96. Dinarello CA (1998). Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann NY Acad Sci* 29, 1-11.

97. Cadherins as Modulators of Cellular Phenotype *Annual Review of Cell and Developmental Biology* Vol. 19: 207-235 (Volume publication date November 2003) First published online as a Review in Advance on June 20,

2003 doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.011102.111135 Margaret J. Wheelock and Keith R. Johnson.

98. Gooding JM, Yap KL, Ikura M. The cadherin-catenin complex as a focal point of cell adhesion and signalling: new insights from three-dimensional structures. *Bioessays* 2004; 26(5): 497-511.

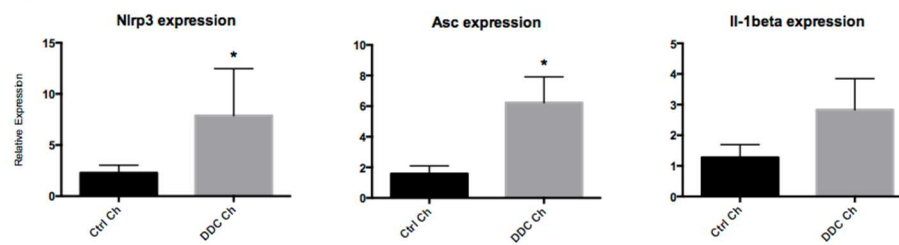
8. FIGURE

FIGURA 1

Espressione di NLRP3 nei colangiociti reattivi. (A) I colangiociti sono stati isolati da topi wild type (wt) alimentati per 8 settimane con la dieta DDC, come modello di colangite sclerosante, e da topi sottoposti a dieta di controllo. I livelli di espressioni di mRNA di NLRP3, delle proteine adattatrici ASC, e di IL-1 β risultano aumentati nei colangiociti di topi sottoposti a dieta con DDC, rispetto alla dieta di controllo. I dati sono espressi come media $\pm$ SD nei 3 esperimenti ; *: $p < 0.05$ vs. colangiociti di controllo. (B) Il fegato umano normale (sinistra) è risultato negativo per l'immunoistochimica di NLRP3. L'immunoistochimica mostra uno staining positivo per NLRP3 nei colangiociti di sezioni di fegato di pazienti affetti da PSC (destra). Le frecce indicano i dotti biliari; ingrandimento 20X.

Figura 1

A



B

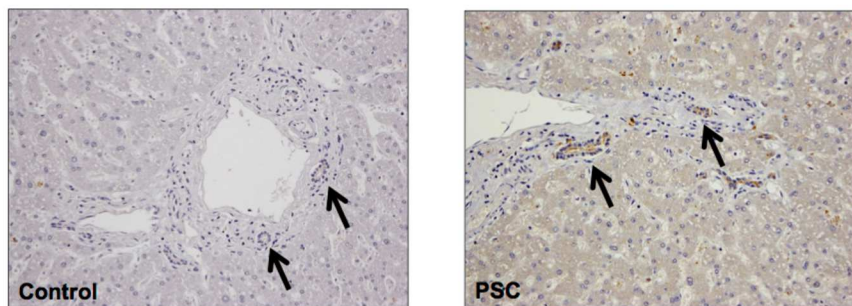


FIGURA 2

Effetto dell'attivazione di NLRP3 sulla sintesi di citochine nei colangiociti in coltura.

L'attivazione dell'inflammosoma NLRP3 è stato indotto nei colangiociti in coltura dall'incubazione sequenziale con LPS (200 ng/ml; per 24 ore) seguito dalla somministrazione di ATP (5 mM, per 1, 3, e 6 ore). L'incubazione con LPS/ATP induce l'espressione di NLRP3 (A) nei colangiociti in coltura. La stessa incubazione determina un significativo aumento nei livelli di espressione nella qPCR di IL-18 (B) e IL-6 (C). La stimolazione con LPS/ATP non ha effetti sulla sintesi di IL-1 β (D). I dati sono espressi come media $\pm$ SD nei 3 esperimenti ; *: $p < 0.05$ vs. i colangiociti di controllo.

Figura 2

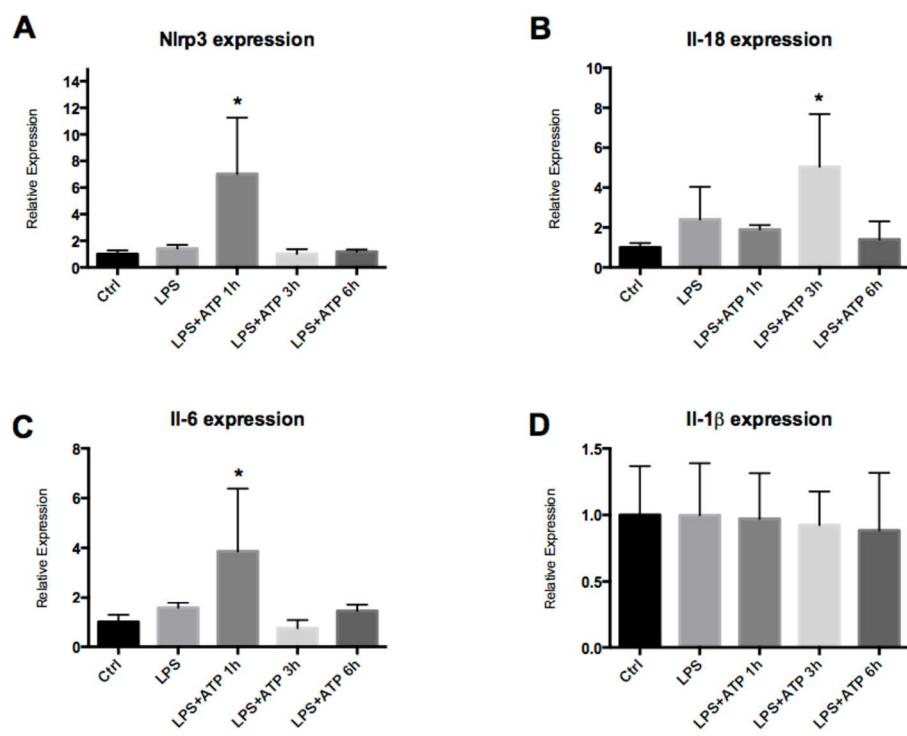


FIGURA 3

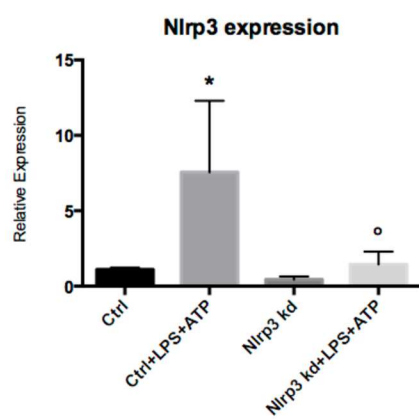
Effetto di NLRP3 knockdown sulla sintesi di NLRP3 e di IL-18 nei colangiociti. (A) Il silenziamento di NLRP3 ad opera di specifici siRNA diminuisce l'espressione di NLRP3 nel 70% nelle cellule di controllo, e mostra una riduzione significativa nelle cellule trattate con LPS/ATP.

(B) Il silenziamento di NLRP3 abolisce l'aumento nell'espressione di IL-18 indotto dall'incubazione con LPS/ATP.

I dati sono espressi come media $\pm$ SD nei 3 esperimenti; *: $p < 0.05$ vs. i colangiociti di controllo; °: $p < 0.05$ verso il controllo di valore corrispondente.

Figura 3

A



B

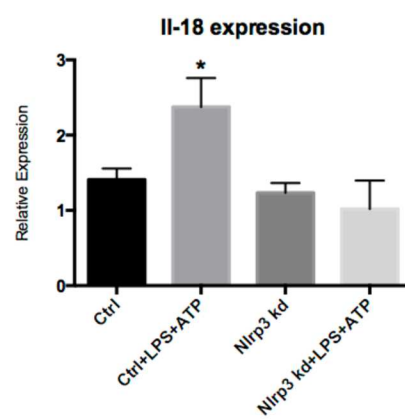


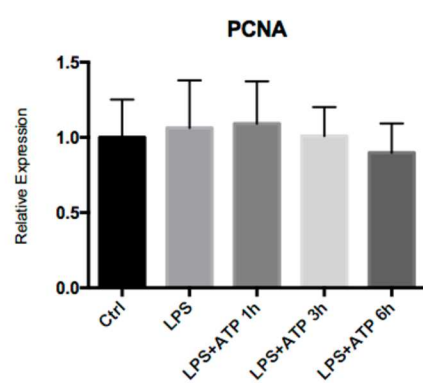
FIGURA 4

Ruolo dell'attivazione di NLRP3 sulla proliferazione biliare *in vitro*. L'attivazione dell'inflammosoma NLRP3 nei colangiociti in coltura è stata indotta da incubazioni sequenziali con LPS (200 ng/ml; per 24 ore) seguito dalla somministrazione di ATP (5 mM, per 1, 3, e 6 ore).

L'attivazione di NLRP3 non ha effetti sui livelli di espressione dell'mRNA di PCNA (A) e Ki-67 (B), escludendo così un ruolo essenziale dell'inflammosoma nella regolazione della proliferazione biliare *in vitro*.

Figura 4

A



B

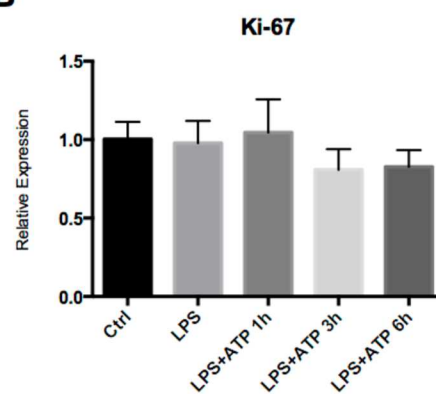


FIGURA 5

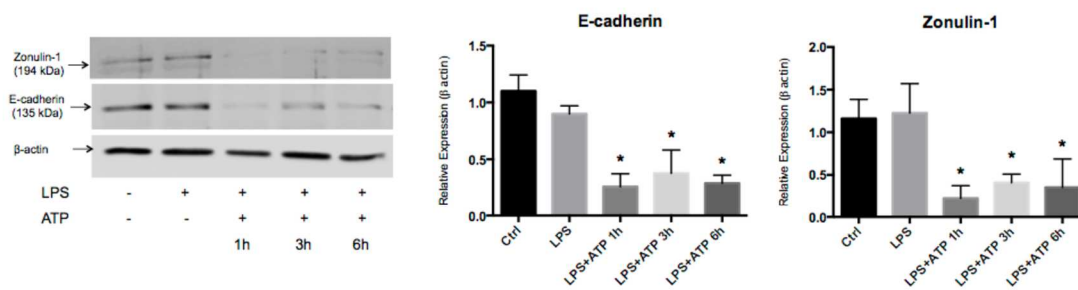
Ruolo dell'attivazione dell'inflammosoma NLRP3 sulle funzioni della barriera epiteliale dei colangiociti in coltura.

(A) L'attivazione di NLRP3 in colture di colangiociti con incubazioni sequenziali di LPS/ATP ha comportato la riduzione dell'espressione delle proteine E-caderina e Zonulina-1. Sinistra: Immunoblot rappresentativi per l'E-caderina e la Zonulina-1. Centro e destra: quantificazione dell'E-caderina e della Zonulina-1, proteine espresse dalla scansione video della densitometria.

(B) Il silenziamento di NLRP3 abolisce la diminuzione dell'E-caderina (sinistra) e della Zonulina-1 (destra) indotta dall'incubazione con LPS/ATP nelle colture di colangiociti. I dati sono espressi come media $\pm$ SD di 3 esperimenti ; *: $p < 0.05$ vs. i colangiociti di controllo.

Figura 5

A



B

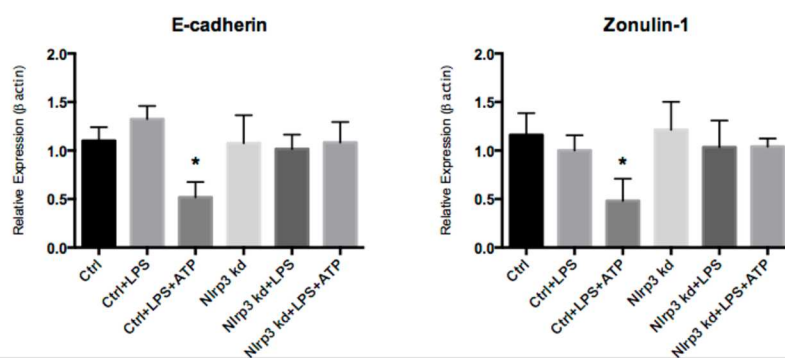


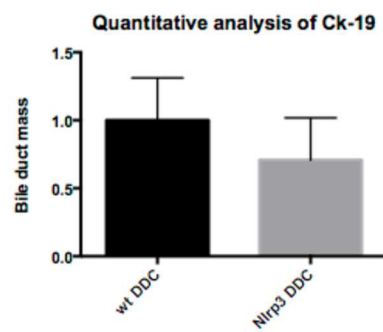
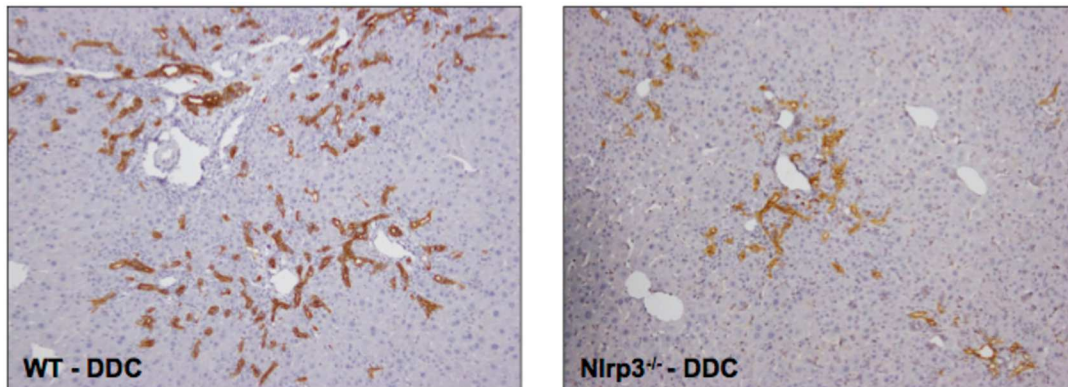
FIGURA 6

Ruolo di NLRP3 nella proliferazione dei colangiociti in vivo. (A) L'aumento della massa biliare (valutato mediante immunistochemica per Ck-19) è significativamente ridotto nei topi *Nlrp3*^{-/-} trattati con DDC rispetto a topi WT sottoposti alla stessa dieta. In alto: immagine rappresentativa dell'immunostaining con Ck-19 (positivo in marrone) nei differenti gruppi sperimentali (ingrandimento originale 10X). In basso: analisi quantitativa dell'immunostaining con Ck-19. I dati sono espressi come media $\pm$ SD; *: $p < 0.05$ vs topi wild type con dieta DDC.

(B) Figura rappresentativa dell'immunostaining dell'E-caderina in topi wild type e topi *Nlrp3*^{-/-} alimentati con DDC (ingrandimento originale 20X). L'espressione dell'E-caderina tende ad essere più elevata in topi *Nlrp3*^{-/-}, in *vitro* i risultati mostrano che l'attivazione dell'inflammosoma compromette l'integrità della barriera epiteliale.

Figura 6

A



B

