

30. aprile

The road of death

*Conta solo il cammino,
perché solo lui è duraturo e non lo scopo,
che risulta essere soltanto l'illusione del viaggio.*

Antoine de Saint-Exupery

The road to death:

Caspases, cleavage and pores

Visha Dixit

Visha Dixit è uno degli scienziati più citati al mondo, alcune delle sue pubblicazioni hanno raccolto più di 2.000 citazioni. Il suo lavoro sull'**apoptosi** e sulle **interleuchine** sono stati considerati dal *Journal of Immunology* uno dei "pilastri dell'immunologia". Questa settimana Dixit in un report su **Science Advances** racconta le sue scoperte preferite dopo oltre 30 anni di studio delle proteine che consentono la morte di cellule infette, danneggiate o obsolete. Oggi riporto il suo racconto e la sua incredibile esperienza di ricercatore. Buona lettura a tutti



SEGNALAZIONE DEL RECETTORE DI MORTE

Come patologo che studiava la coagulazione del sangue alla fine degli anni '80, ero pronto a spostare i campi verso qualcosa di nuovo ed eccitante. L'apoptosi, una forma immunologicamente silente di morte cellulare, sembrava promettente. I patologi **Andrew Wyllie, Alastair Currie e John Kerr** avevano recentemente caratterizzato l'apoptosi morfologicamente nei tessuti dei mammiferi e stavano emergendo le prove di un programma genetico sottostante. Mi chiedevo se potevo separare il percorso di segnalazione che provocava la morte per apoptosi.

Avevo un minimo di formazione in biochimica, ma mi mancava un sistema di coltura cellulare facile e scalabile per innescare l'apoptosi in modo sincronizzato. Per un certo periodo, trovare un sistema del genere è sembrato un compito da pazzi. **Shin Yonehara e Peter Krammer** hanno risolto questo problema nel 1989 quando hanno descritto un anticorpo monoclonale che induceva l'apoptosi nelle cellule in coltura. La corsa era ora in corso per identificare il recettore della superficie cellulare che l'anticorpo ha coinvolto.

Il formidabile **Shigekazu Nagata** ha clonato e caratterizzato il recettore nel 1991, da allora in poi denominato **Fas/Apo-1/CD95**.

Il recettore era molto simile nella sequenza al principale recettore per il fattore di necrosi tumorale (TNF), che potrebbe anche essere coinvolto in particolari linee cellulari per indurre l'apoptosi. Per semplicità, li chiamerò i "**recettori della morte**".

Curiosamente, la porzione citosolica dei recettori della morte non ha rivelato una modalità ovvia per segnalare l'apoptosi. Nessuno dei due recettori della morte aveva un dominio enzimatico, come una chinasi, né un motivo vincolante per le modifiche post-traduzionali.

Il famoso biologo molecolare **David Goeddel** ha tuttavia notato che entrambi contenevano un segmento citosolico conservato di circa 80 residui. La mutazione di questi residui ha disabilitato i recettori della morte e ha impedito loro di segnalare l'apoptosi, portando il suo gruppo a denominare questo segmento il "**dominio della morte**" (**abbreviato DD**) nel 1993. Ora avevo un sistema per affrontare il "percorso della morte" a valle dei recettori della morte.

Ho avuto una competizione importante sotto forma di **Nagata, Krammer e Goeddel**, ma ho deciso di gettare al vento la prudenza. Questa è stata la mia opportunità per perseguire il mio sogno d'infanzia di trovare qualcosa di completamente nuovo. Ero arrivato troppo lontano per non oscillare per le recinzioni.

Ho pensato che l'unico modo per combattere i titani nella loro arena fosse trovare inibitori della morte cellulare. A quel tempo, ero convinto che la pura grinta e determinazione avrebbero prodotto inibitori tra le migliaia di sostanze chimiche disponibili in commercio, ovvero il catalogo Sigma-Aldrich. Questi inibitori sarebbero gli strumenti che mi permetterebbero di illuminare i misteriosi componenti a valle dei recettori della morte.

Il duro lavoro ha dimostrato la parte facile. Un brillante e ambizioso studente MD/PhD, **Muneesh Tewari**, e un tecnico, **Karen O'Rourke**, hanno contribuito a stabilire il sistema. Abbiamo indotto facilmente l'apoptosi usando il TNF ricombinante di Genentech o l'anticorpo agonista Fas di Yonehara.

Il conseguente caos al microscopio è stato avvincente da guardare. Le cellule subirono un'indimenticabile e violenta danza della morte. Il nucleo si è condensato, le membrane si sono

formate vesciche e quindi la cellula si è frammentata in sacche racchiuse nella membrana, note come corpi apoptotici. Tuttavia, i nostri sforzi per identificare un inibitore chimico dell'apoptosi fallirono. Qualunque cosa abbiamo testato non ha funzionato o ha avuto solo un effetto marginale. Ci siamo chiesti se i componenti del percorso potessero avere ridondanze incorporate. In tal caso, il progetto era morto.

Nel frattempo, linee di indagine apparentemente disparate fornivano importanti indizi sul campo della morte cellulare.

Nel 1992, **Roy Black e Nancy Thornberry** descrissero una proteasi di cisteina molto insolita, che chiamarono **enzima di conversione dell'interleuchina-1 (IL-1) o ICE**. Insolitamente specifico, l'ICE ha scisso IL-1 dopo i residui di acido aspartico. Era anche notevolmente simile nella sequenza alla proteina codificata dal gene della morte di *Caenorhabditis elegans*, *ced3*, che **Robert Horvitz** aveva identificato nel 1986. Il laboratorio di Horvitz ha mostrato nel 1993 che *ced3* codificava una proteasi con specificità di substrato e proprietà simili a ICE.

I recettori della morte hanno attivato una proteasi simile a ICE?

Ci siamo resi conto che dovevamo testare rapidamente questa nozione perché il campo stava avanzando rapidamente. Sapevamo che **David Pickup e Guy Salvesen** della Duke University avevano identificato un potente inibitore ICE nella serpina codificata dal poxvirus chiamata **CrmA**. Generosamente, ci hanno inviato un costrutto di espressione per **CrmA**.

Una sera tardi, abbiamo colpito l'oro. Sbirciando al microscopio, come Howard Carter scruta nella tomba di Tutankhamon gli immensi tesori, abbiamo visto **CrmA** inibire completamente l'apoptosi indotta dagli agonisti del recettore della morte Figura 11A

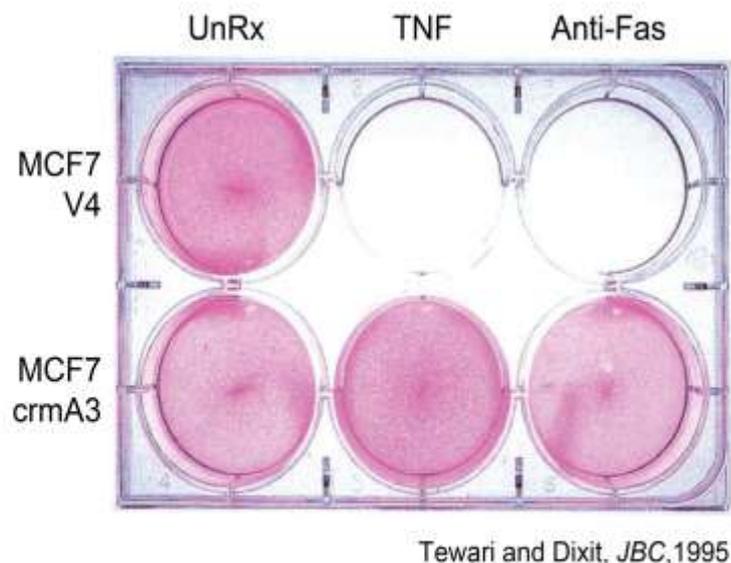


Fig. 1 . Segnalazione del recettore della morte.

(A) Cellule di carcinoma mammario MCF7 che esprimono poxvirus CrmA sopravvivono alla sfida letale con TNF o anticorpo agonista anti-Fas. Riprodotto da (1). DISCO è cementato da interazioni omotipiche tra DD e DED. L'attivazione della caspasi-8 all'interno del DISCO suscita le subunità catalitiche p18 e p10 (evidenziate in giallo), che trasmettono il segnale di morte scindendo e attivando le caspasi effettrici a valle, tra cui YAMA/caspasi-3. La scissione dei substrati vitali porta alla scomparsa della cellula.

La conclusione è stata inequivocabile. I recettori della morte devono coinvolgere l'ICE o una proteasi simile all'ICE per iniziare l'apoptosi

Tewari M, Dixit VM. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. J Biol Chem. 1995 Feb 17;270(7):3255-60.

Negli studi di follow-up, **Muneesh** ha identificato la proteasi del boia simile a ICE e l'ha chiamata YAMA per il dio indù della morte (2).

Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. Cell. 1995 Jun 2;81(5):801-9.

ICE e YAMA erano membri fondatori di una famiglia di proteasi dei mammiferi chiamate caspasi e alla fine furono ribattezzate rispettivamente **caspase-1 e caspase-3**. Il nome caspase denota che sono proteasi della cisteina (c) che si scindono dopo i residui di acido aspartico (aspase).

Avanti con il prossimo mistero: in che modo i recettori della morte hanno attivato le caspasi?

All'inizio degli anni '90, i ricercatori credevano che i recettori segnalassero agendo come canali ionici o alterando gli eventi di fosforilazione-defosforilazione. Due ricercatori di talento nel mio laboratorio, **Arul Chinnaiyan e Marta Muzio**, hanno scoperto rapidamente un meccanismo completamente nuovo attraverso il quale i recettori possono segnalare. **Arul** scoprì nel 1995 che il DD, definito in precedenza da Goeddel, rappresentava un motivo di interazione proteina-proteina omotipico. In altre parole, un DD in una proteina può legarsi al DD in un'altra, collegando così insieme le proteine. **Arul** ha dimostrato che la DD in Fas recluta la proteina DD associata a Fas (FADD). La sua seconda scoperta è stata che FADD ha un secondo motivo correlato, che ha chiamato il dominio effettore della morte (DED).

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell. 1995 May 19;81(4):505-12. doi: 10.1016/0092-8674(95)90071-3. PMID: 7538907.

La missione di **Marta** era identificare la proteina che interagisce con la DED nella FADD. Collaborando con i laboratori di **Matthias Mann e Krammer**, **Marta** ha dimostrato nel 1996 che il FADD DED si lega alla pro-caspasi-8, che è la forma inattiva della proteasi. Pro-caspase-8 ha due DED nel suo dominio pro. Il complesso è composto da Fas, FADD e pro-caspase-8, che hanno soprannominato il complesso di segnalazione che induce la morte (DISC)

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. Cell. 1996 Jun 14;85(6):817-27. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81266-0. PMID: 8681377.

David Wallach è giunto a conclusioni simili

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. Cell. 1996 Jun 14;85(6):803-15. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81265-9. PMID: 8681376.

Successivamente, in collaborazione con **Guy Salvesen**, abbiamo dimostrato che la pro-caspasi-8 è attivata dalla prossimità indotta. La dimerizzazione e l'autoelaborazione della pro-caspasi-8 all'interno del DISC rilasciano la caspasi-8 attiva, che quindi si scinde e attiva la caspasi-3 e la

caspi-7. Questa cascata di caspasi scatena una precipitosa attività proteolitica che smantella la cellula in modo sorprendentemente ordinato e riproducibile (figura 1B)

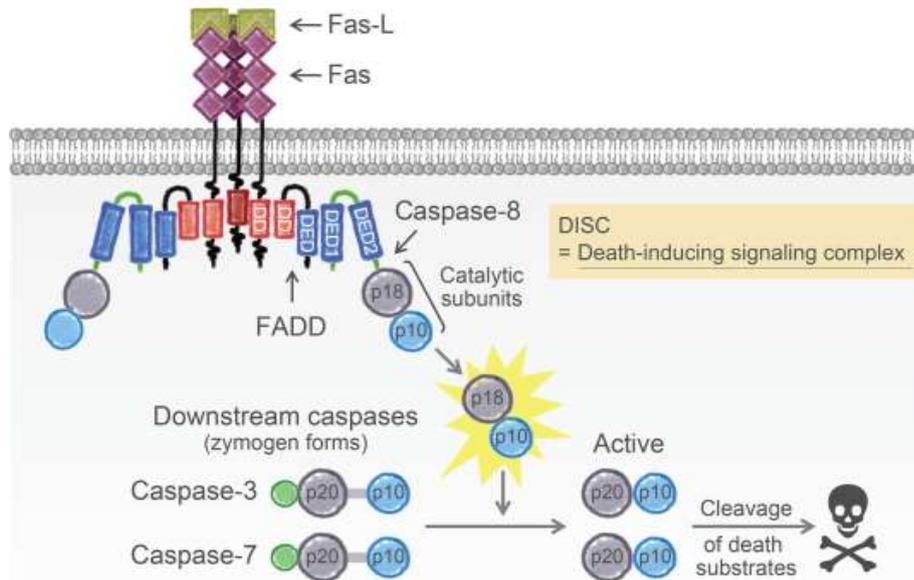


Figura 1B

I DISC assemblato dal ligando Fas (Fas-L) è composto dal recettore della morte Fas, dalla molecola adattatrice FADD e dalla pro-caspasi-8. Il DISCO è cementato da interazioni omotipiche tra DD e DED. L'attivazione della caspasi-8 all'interno del DISCO suscita le subunità catalitiche p18 e p10 (evidenziate in giallo), che trasmettono il segnale di morte scindendo e attivando le caspasi effettrici a valle, tra cui YAMA/caspasi-3. La scissione dei substrati vitali porta alla scomparsa della cellula.

Sono stato rincuorato e rinvigorito dal nostro inaspettato successo. Avevamo identificato una grande lacuna nella nostra comprensione di come i recettori della morte segnalano, affrontato il problema a testa alta e usato la nostra eccitazione per indurre altri scienziati a collaborare. Farei affidamento su queste intuizioni mentre facevo un altro importante cambiamento di carriera, passando dal mondo accademico all'industria. Nel 1997, ho accettato l'incarico di direttore dell'oncologia molecolare alla Genentech, dove il mio gruppo ha scoperto che le cellule potevano usare un altro percorso per morire diverso dall'apoptosi.

GLI INFIAMMATORI

Ho preso parte a molte scoperte entusiasmanti nel corso degli anni, ma considero la scoperta dell'inflammasoma non canonico con **Nobuhiko Kayagaki** nel 2011 il mio altro importante contributo alla biologia molecolare. Nel 2002, il defunto **Jurg Tschopp** ha coniato il termine inflammasoma per descrivere il complesso intracellulare che attiva la caspasi-1 quando microrganismi o insulti endogeni violano il compartimento citoplasmatico. Questo complesso di segnalazione è composto da un sensore e un adattatore, che insieme formano una piattaforma che attiva la pro-caspasi-1 **Figura 2A**

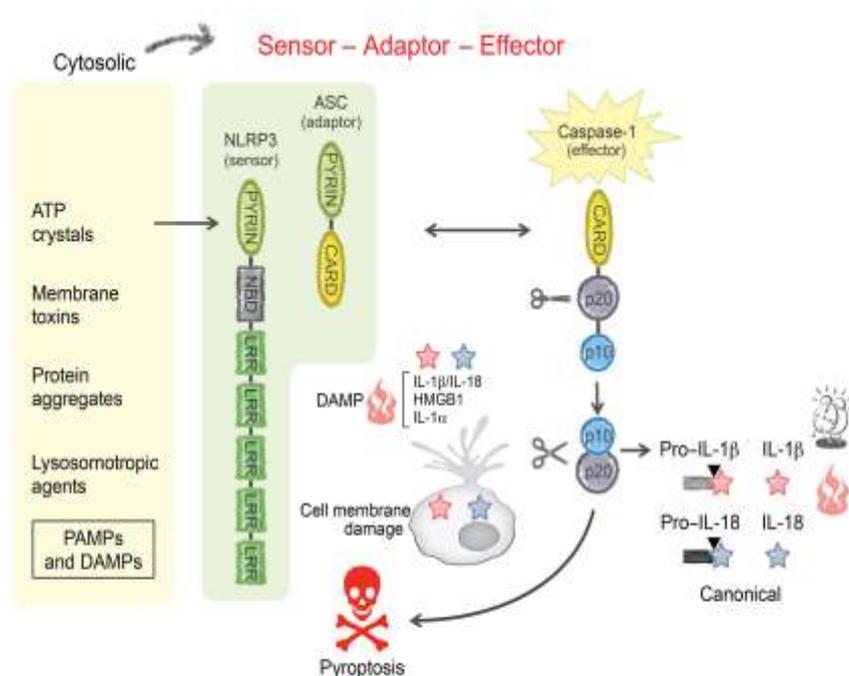
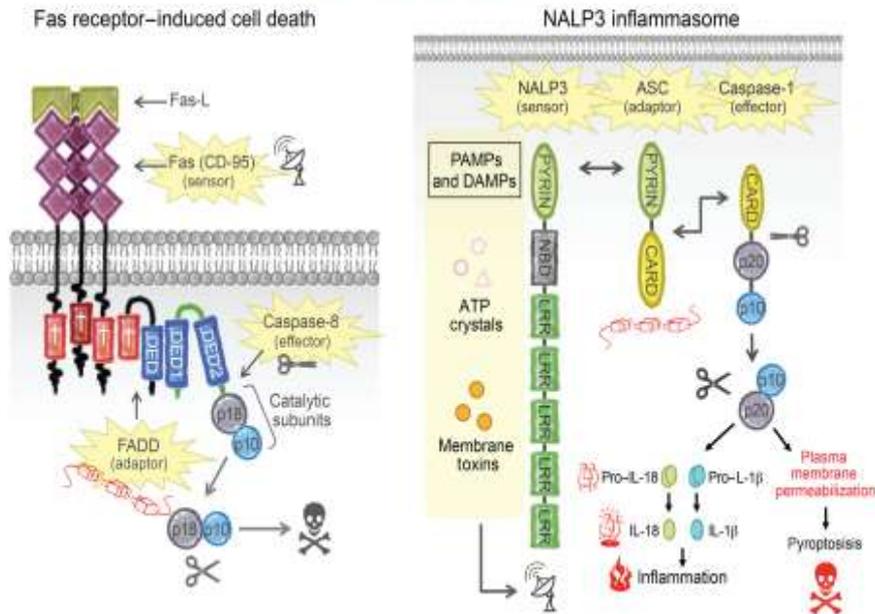


Fig. 2 . Segnalazione canonica dell'inflammasoma.

(A) L'inflammasoma canonico è composto da un sensore intracellulare, l'adattatore ASC e la caspasi-1. Il sensore prototipo NLRP3 è attivato da agenti che interrompono il compartimento citosolico, inclusi adenosina trifosfato, agenti lisosomotropici, cristalli e aggregati proteici. NLRP3 si lega all'ASC, che a sua volta si lega allo zimogeno pro-caspasi-1 (forbici chiuse). I domini PYRIN e CARD sono motivi di interazione proteina-proteina omotipici che tengono insieme il complesso. La caspasi-1 attiva (forbici aperte) scinde rispettivamente pro-IL-1 β e pro-IL-18 in IL-1 β attivo e IL-18. I DAMP proinfiammatori IL-1 β , IL-18, IL-1 α e HMGB1 mancano ciascuno di un peptide segnale ma vengono rilasciati dalla cellula dalla piroptosi, una forma litica di morte cellulare.

L'assemblaggio dell'inflammasoma è innescato da modelli molecolari associati ai patogeni (PAMP) derivati da microrganismi invasori o da insulti endogeni, come i cristalli di acido urico, che agiscono come modelli molecolari associati al pericolo (DAMP). L'attivazione della pro-caspasi-1 all'interno dell'inflammasoma, sempre attraverso un meccanismo di prossimità indotto, ha due conseguenze di cruciale importanza per l'immunità innata. La caspasi-1 scinde le forme immature di IL-1 β e IL-18 per generare le citochine attive e, parallelamente, la caspasi-1 scinde il gasdermin D (GSDMD) per rilasciare un frammento che forma pori che uccide la cellula perforando la membrana. Questa forma infiammatoria di morte cellulare è chiamata piroptosi. Di conseguenza, IL-1 β e IL-18 mature, prive di una sequenza segnale per la secrezione,

I sensori che assemblano gli inflammasomi riconoscono insulti specifici. Il sensore NLRC4, ad esempio, rileva i patogeni intracellulari Gram-negativi, come *Salmonella* e *Shigella*, rilevando i PAMP associati, inclusa la flagellina. Un sensore diverso, NLRP3, risponde ai mediatori dell'infiammazione come l'acido urico o lo ionoforo nigericina. Ogni sensore ha un motivo di interazione proteina-proteina sotto forma di un dominio di attivazione e reclutamento della caspasi (CARD) o di un dominio Pyrin. Entrambi i domini CARD e Pyrin sono strutturalmente correlati ai DD e DED discussi in precedenza. I sensori del dominio della pirina come NLRP3 attivano la pro-caspasi-1 contenente la CARD attraverso l'adattatore, ASC, che ha sia un dominio della pirina che una CARD. Pertanto, il DISCO e l'inflammasoma condividono un'architettura comune (sensore-adattatore-caspasi) e sono cementati da motivi di interazione correlati. **Figura 2B**

B**Sensor – Adaptor – Effector****Figura 2b**

Il Fas DISC e l'inflammasoma NLRP3 condividono un'architettura simile; ognuno di essi utilizza motivi di interazione proteina-proteina correlati per riunire un sensore, un adattatore e una caspasi.

SCOPERTA DELL'INFLAMMASOMA NON CANONICO

La scoperta dell'inflammasoma non canonico è iniziata con un piagnucolio piuttosto che con un botto. Nel 2010, stavamo testando vari PAMP per determinare se attivassero l'inflammasoma nei macrofagi derivati dal midollo osseo di topo (BMDM). Abbiamo notato che la subunità B della tossina del colera (CTB) ha attivato l'inflammasoma nelle cellule dei topi C57BL/6 ma non dei topi 129/SvEv

Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M, Dixit VM. [Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. Nature. 2011 Oct 16;479\(7371\):117-21.](#)

La scoperta era strana, ma forse i topi 129/SvEv mancavano di un noto componente inflammasoma. Curiosamente, tuttavia, i BMDM 129/SvEv hanno attivato bene l'inflammasoma in risposta ad altri PAMP o DAMP. Infatti, le cellule 129/SvEv esprimevano tutti i sensori conosciuti, l'adattatore ASC e la caspasi-1. Abbiamo concluso che le celle 129/SvEv devono essere prive del sensore specifico per CTB.

Incuriositi, abbiamo ampliato la nostra ricerca, solo per scoprire che i topi 129/SvEv mancano di caspasi-11, una caspasi con sostanziale omologia con la caspasi-1. Una mutazione di splicing nel gene 129/Sv *Caspase-11* altera il frame di lettura, portando al decadimento mediato da sciocchezze della trascrizione corrotta di *Caspase-11*.

Questa scoperta ha suggerito che l'inflammasoma aveva bisogno della caspasi-11 per rispondere al CTB. Abbiamo cercato conferma di questa dipendenza inaspettata utilizzando topi carenti di caspasi-1 o caspasi-11.

Tuttavia, siamo presto giunti alla sconcertante consapevolezza che l'originale topo knockout *Caspase-1*, utilizzato in centinaia di pubblicazioni, in realtà mancava sia di caspase-1 che di caspase-11. Generato in *Caspase-11* – cellule staminali embrionali carenti di 129/Sv, la *Caspase-1* allele knockout era proprio accanto al mutante *Caspase-11* e i due alleli non potevano essere facilmente separati. Di conseguenza, tutte le conclusioni derivate utilizzando questi topi dovrebbero essere rivalutate. Tutti i fenotipi riportati potrebbero essere dovuti a un deficit di caspase-1, caspase-11 o entrambi. Ho descritto questi risultati a un pubblico scioccato al **meeting Toll 2011 in Italia**.

Molti si chiedevano fino a che punto il campo fosse stato deviato da questa svista.

Ci siamo affrettati a generare un knockout *Caspase-11* nel ceppo di topo C57BL/6 e abbiamo anche ricostituito l'espressione di caspase-11 nel doppio knockout *Caspase-1 / -11* con un transgene *Caspase-11*. I risultati utilizzando questi topi erano inequivocabili. Caspase-11 è essenziale per l'impegno dell'inflammasoma da parte di enteropatogeni Gram-negativi, tra cui *Escherichia coli* e *Citrobacter rodentium*. Abbiamo designato questo nuovo condotto di segnalazione dipendente dalla caspasi-11 come via dell'inflammasoma non canonico

*Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, Newton K, Qu Y, Liu J, Heldens S, Zhang J, Lee WP, Roose-Girma M, Dixit VM. [Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11](#). *Nature*. 2011 Oct 16;479(7371):117-21. doi: 10.1038/nature10558. PMID: 22002608*

Una domanda ora incombeva: quale componente degli organismi Gram-negativi innesca il percorso non canonico?

Eravamo entusiasti di affrontare questa domanda clinicamente rilevante. L'infiammazione sistemica fuori controllo associata alla sepsi Gram-negativa è responsabile di milioni di morti ogni anno. Lo strumento molecolare che avevamo in mano per intraprendere il percorso non canonico era il CTB. Speravamo di usarlo per rivelare il preciso innesco comune a tutti i batteri Gram-negativi, ma si è rivelata un'impresa ardua, lunga e molto frustrante. Le complessità del test dell'inflammasoma ci hanno sventato.

Per ottenere una robusta attivazione dell'inflammasoma, i BMDM devono prima essere innescati con uno stimolo infiammatorio che regola l'espressione di un numero di componenti rilevanti, tra cui caspase-11 e IL-1 β . L'adescamento è in genere realizzato con un agonista del recettore Toll-like (TLR).

Perplesso, abbiamo scoperto che CTB ha attivato in modo robusto l'inflammasoma quando abbiamo innescato i BMDM con il lipopolisaccaride (LPS) agonista TLR4 ma non quando è stato utilizzato l'agonista TLR2 Pam3CSK4. Al contrario, entrambi i metodi di adescamento supportavano l'attivazione dell'inflammasoma da parte di altri stimoli.

A complicare ulteriormente le cose, solo il priming con uno specifico sierotipo LPS, O111:B4, consentirebbe quindi al CTB di attivare la caspasi-11.

Abbiamo lottato duramente per dare un senso ai dati. Un indizio importante era che il CTB si lega al polisaccaride dell'antigene O ipervariabile del sierotipo O111:B4 di LPS, ma non si lega ai sierotipi di LPS con antigeni O distinti. Ci siamo chiesti se CTB, che normalmente trasporta la subunità CTA nelle cellule, fosse semplicemente il corriere che consegnava LPS O111:B4, riportato dalla fase di priming, nel citoplasma (Fig. 3A).

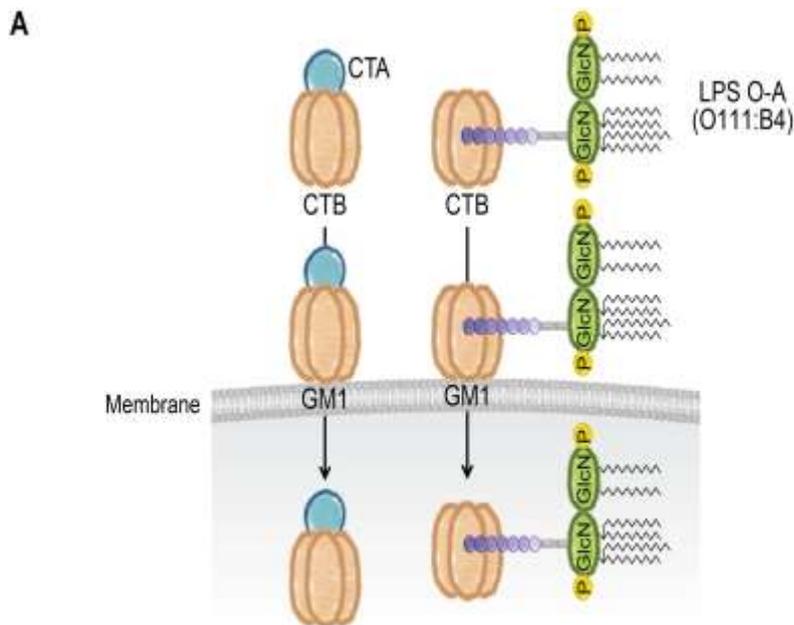


Fig. 3 . L'inflammasoma non canonico.

(A) Il CTB si lega ai gangliosaccaridi della membrana plasmatica GM1 per rilasciare nel citoplasma il sierotipo CTA (a sinistra) o LPS O111:B4 (a destra). Il CTB si lega alla catena polisaccaridica O-specifica iperdivergente del sierotipo O111:B4 di LPS.

Ci siamo resi conto che LPS, indipendentemente dal sierotipo, potrebbe essere in grado di attivare il percorso non canonico a condizione che possa accedere al citoplasma. In effetti, l'LPS introdotto dalla trasfezione ha superato la restrizione del sierotipo ([Fig. 3B](#)).

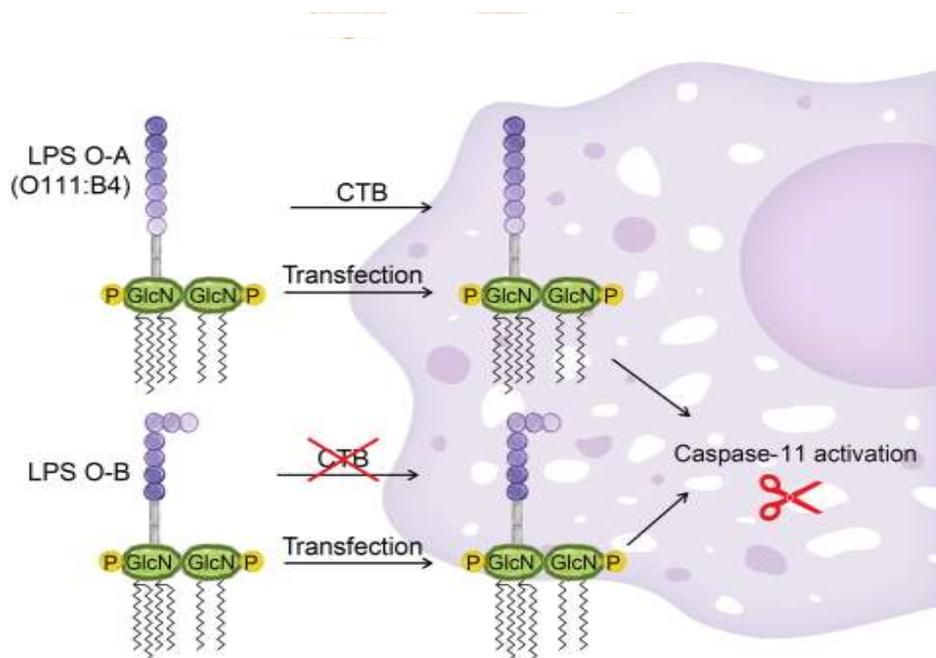


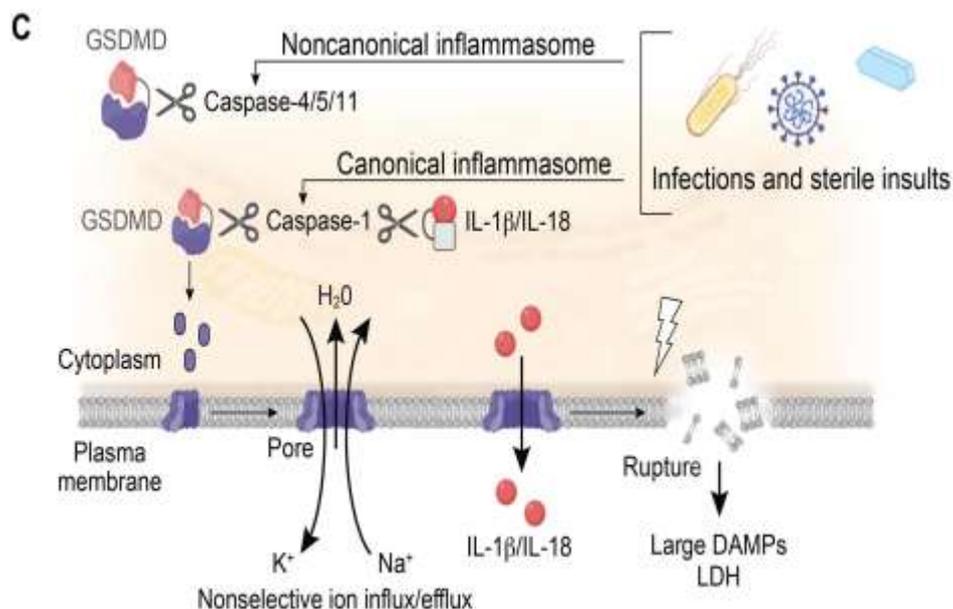
Fig 3B (B) LPS sierotipo OA (include O111:B4) si lega a CTB per accedere al citosol. Al contrario, il sierotipo OB di LPS non si lega a CTB e pertanto non può accedervi. Entrambi i sierotipi, tuttavia, possono essere introdotti mediante trasfezione.

Abbiamo concluso che LPS, un componente comune degli organismi Gram-negativi, è un fattore scatenante del percorso non canonico. Ulteriori studi di trasfezione hanno rivelato che la porzione lipidica A conservata di LPS è essenziale per l'attivazione della caspasi-11, mentre la porzione di antigene O ipervariabile è superflua. Contemporaneamente, il laboratorio di Edward Miao ha dimostrato anche che l'LPS citosolico attiva la caspasi-11.

Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA. *Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock.* Science. 2013 Sep 13;341(6151):1250-3.

I patogeni Gram-negativi contengono una pletera di PAMP. Pertanto, dovevamo essere sicuri che fosse solo LPS e non PAMP aggiuntivi ad attivare la caspasi-11. Per rispondere definitivamente a questa domanda, abbiamo utilizzato un ceppo di *E. coli* carente nella penultima fase della sintesi di LPS. Gratificante, questo ceppo non riesce ad attivare la caspasi-11. Avevamo dimostrato che il percorso non canonico era dedicato alla rilevazione di LPS intracellulare. Questo percorso non canonico non richiede il noto recettore LPS TLR4 perché l'inflammasoma non canonico è completamente funzionante nei topi knockout *Tlr4*. Il Premio Nobel 2011 è stato assegnato per la scoperta di TLR4 come recettore LPS ma i nostri risultati con caspasi-11 hanno dimostrato che esiste un altro sensore LPS con una funzione distinta.

Ravindran S. *Profile of Bruce A. Beutler.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug 6;110(32):12857-8.



Caspase-1 o caspase-11 scinde GSDMD, rilasciando un frammento p30 N-terminale che si oligomerizza in un poro di circa 20 nm. I pori GSDMD collassano il gradiente elettrochimico e rilasciano DAMP, inclusi IL-1β e IL-18, nell'ambiente extracellulare.

EPILOGO

La nostra scoperta del percorso non canonico come sensore LPS citosolico ha innescato una corsa all'oro che ha portato a rapidi progressi da parte del nostro laboratorio e di altri. In particolare, ciò ha incluso la scoperta di GSDMD come substrato a valle per la caspasi-1 e la caspasi-11. Le entusiasmanti scoperte continuano ancora oggi.

Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. [Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death.](#) Nature. 2015 Oct 29;526(7575):660-5.

Nel 2021, abbiamo scoperto che la lisi cellulare a seguito della rottura della membrana non è un evento passivo mediato da forze osmotiche, come farebbero credere i libri di testo introduttivi di biologia, ma piuttosto attivamente accelerato da una proteina di membrana, NINJ1 (12).

Kayagaki N, Kornfeld OS, Lee BL, Stowe IB, O'Rourke K, Li Q, Sandoval W, Yan D, Kang J, Xu M, Zhang J, Lee WP, McKenzie BS, Ulas G, Payandeh J, Roose-Girma M, Modrusan Z, Reja R, Sagolla M, Webster JD, Cho V, Andrews TD, Morris LX, Miosge LA, Goodnow CC, Bertram EM, Dixit VM. [NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death.](#) Nature. 2021 Mar;591(7848):131-136.

Cosa ho imparato durante la mia carriera oltre alla persistenza?

Scegli un problema importante, lascia che siano i dati a parlare e fai esperimenti che sfidano le tue nozioni preconette.

Un anno fa... Baedeker/Replay del 30 aprile 2022

Consigli su come respirare durante una pandemia

I ricercatori del Centro di Ingegneria e biomeccanica bioispirato (BEBC), Università di Xi'an Jiaotong (Cina) in un report "avvincente" consigliano su come respirare durante una pandemia in particolare consigliano di evitare di trattenere il respiro: insomma respirate !

La respirazione fa molto di più che garantire l'ossigenazione dei nostri tessuti. Con le sue forze meccaniche dinamiche e regolari, la respirazione è coinvolta in tutti i tipi di processi, compreso lo sviluppo polmonare e la regolazione delle risposte immunitarie. Attraverso l'utilizzo di un dispositivo microfluidico (un chip alveolare impiantato nel polmone umano che riassume la fisiologia delle vie aeree umane) per monitorare l'infezione influenzale H3N2. (Bai Y et al *Recombinase polymerase amplification integrated with microfluidics for nucleic acid testing at point of care.* Talanta. 2022 Apr 1;240:123209) **hanno scoperto che il movimento respiratorio ciclico inibisce l'infezione virale attivando il canale ionico meccanosensibile TRPV4, che induce l'epitelio polmonare e l'endotelio a produrre la proteina S100 allarmina.**

Questi mediatori legano il recettore di riconoscimento del **pattern RAGE**, che attiva diversi programmi di risposta immunitaria innata che aiutano a combattere il virus. Il recettore di riconoscimento del pattern RAGE, (recettore per prodotti finali di glicazione avanzata), è stato implicato nella migrazione dei leucociti. RAGE è un recettore multiligando sulle cellule vascolari che gioca un ruolo chiave nei processi infiammatori è espresso a bassi livelli nei tessuti normali e nel sistema vascolare e diventa sovraregolato nel sistema vascolare diabetico o in altri siti in cui si accumulano i suoi ligandi In particolare, attraverso il riconoscimento delle strutture fibrillari β -sheet, RAGE lega componenti amiloidi, mediatori proinfiammatori simili a citochine della famiglia S100/calgranulina, o amfoterina .

Nei vasi diabetici, i ligandi RAGE includono anche AGE (prodotti finali della glicazione avanzata) di almeno due tipi, addotti (carbrossimetil)-lisina (LMC) e idroimidazoloni. Il legame di questi ligandi con RAGE avvia un'attivazione cellulare sostenuta mediata dalla segnalazione dipendente dal recettore che coinvolge il fattore di trascrizione NF κ B. **Si ritiene che RAGE promuova il fenotipo proinfiammatorio del sistema vascolare diabetico partecipando così alle complicanze vascolari diabetiche** (Chavakis T 2003) Il team coordinato da Sara Chiappalupi del Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Perugia, ha dimostrato che RAGE è essenziale per gli effetti deleteri del sistema renina-angiotensina (RAS), che partecipa all'infezione e al danno multiorgano nei pazienti con COVID-19. Pertanto, RAGE potrebbe essere un attore importante nel COVID-19 grave e sembra essere un utile bersaglio molecolare terapeutico nelle infezioni da SARS-CoV-2. Il lavoro discute anche il ruolo dei polimorfismi del gene RAGE nel predisporre i pazienti a COVID-19 grave. (Chiappalupi 2021) Curiosamente, **un inibitore del TRPV4 è stato in grado di ridurre sia l'infiammazione che la carica virale, suggerendo che questo potrebbe essere un approccio utile**

per il trattamento della polmonite virale. E' proprio vero che La vita non si misura dal numero di respiri che fai , ma dai momenti che ti tolgono il respiro.

Lo aveva capito Thich Nhat Hanh, il monaco buddhista vietnamita, il più popolare maestro Zen al mondo: Il tuo respiro deve fluire con grazia, come un fiume, e non come una catena di aspre montagne o il galoppo di un cavallo.

Riferimenti -Chavakis T et al. The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. J Exp Med. 2003 Nov 17;198(10):1507-15. -Chiappalupi S et al. Hyperactivated RAGE in Comorbidities as a Risk Factor for Severe COVID-19-The Role of RAGE-RAS Crosstalk. Biomolecules. 2021 Jun 12;11(6):876.

Un anno fa... Baedeker/Replay del 30 aprile 2021

BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) : buona la prima!