

- OBIETTIVI

L'interleuchina (IL)-22 è una citochina espressa da varie tipologie di cellule immunocompetenti, tra cui i linfociti T helper di tipo Th17 e Th22 e le cellule NK, coinvolta in una serie di processi patofisiologici cutanei, tra cui quelli associati alla psoriasi, alla riparazione delle ferite e all'immunità innata verso patogeni. Mentre nella psoriasi l'IL-22 ha un ruolo patogenetico, dal momento che induce i processi infiammatori e l'alterazione epidermica tipici della cute lesionale psoriasica, nella riparazione tissutale e nei meccanismi di immunità innata ha un'importante funzione protettiva, promuovendo la proliferazione cellulare e la produzione di sostanze antimicrobiche.

Il processo di riparazione delle ferite cutanee, particolarmente compromesso in individui diabetici, è favorito dall'IL-22 sia in sistemi *in vitro*, ovvero in sistemi cellulari impieganti colture di cheratinociti epidermici, sia *in vivo*, in modelli sperimentali di "wound healing", condotti in animali sani o resi diabetici in seguito a somministrazione di streptozotocina.

Al fine di identificare nuovi strumenti terapeutici utili alla riparazione delle ferite, specialmente in contesti patologici, sono state condotte attività di ricerca che avevano come **obiettivo** quello di validare molecole peptidomimetiche per l'IL-22, in grado cioè di attivare il complesso recettoriale dell'IL-22 nei cheratinociti umani in coltura. In particolare, si è valutata la potenziale azione agonista di alcuni peptidi mimetici per l'IL-22 su cheratinociti umani, in termini di attivazione delle cascate molecolari associate all'attivazione del recettore dell'IL-22.

- ATTIVITA' SVOLTE

Le attività di ricerca svolte si sono basate sull'impiego di peptidi mimetici per l'IL-22, potenzialmente in grado di legarsi al suo recettore e di attivare, quindi, vie di trasduzione del segnale ad esso associate. Tali peptidi, precedentemente identificati e sintetizzati corrispondenti alla regione dell'IL-22 impegnata nel binding recettoriale, sono stati somministrati a colture di cheratinociti umani isolati da cute di soggetti sani, in esperimenti di tempo- e dose-risposta. Tali peptidi sono stati progettati riprendendo quegli amminoacidi della IL-22 coinvolti nel sito di binding con il relativo recettore IL-22R α 1. Sono stati così sintetizzati il pre Helix A-Helix A(pre-HA) avente la sequenza amminoacidica RLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLA che riprende la regione 41-66 della IL-22; il peptide Helix F (HF) caratterizzato dalla sequenza amminoacidica

ESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI corrispondente alla regione 157-179 della citochina; Helix D (HD) con sequenza YMQEVVPFLARLSNRL della regione 114-129 della IL-22.

Al fine, quindi, di identificare la dose ed il tempo ideali, non tossiche, dei peptidi per il trattamento, le colture sono state analizzate inizialmente per il loro grado di proliferazione e vitalità, utilizzando rispettivamente, la metodica CyQuant e la metodica che valutava i livelli di rilascio dell'LDH (lattato deidrogenasi).

Il legame dell'IL-22 al proprio recettore eterodimerico extracellulare, attiva la cascata molecolare dello STAT3 e delle ERK1/2, responsabile degli effetti cellulari patofisiologici sopradescritti. Pertanto, i vari peptidi mimetici per l'IL-22 sono stati successivamente utilizzati sulle colture cheratinocitarie e valutati per la loro capacità di attivare STAT3 ed ERK1/2. A tale scopo, lisati proteici totali da cheratinociti trattati con i mimetici venivano analizzati in esperimenti di Western blotting. Successivamente sono stati anche effettuati esperimenti di competizione tra i mimetici e l'IL-22 su colture cheratinocitarie umane per valutarne l'effettiva attività agonista sul recettore della citochina.

- **RISULTATI CONSEGUITI**

Gli esperimenti di dose- e tempo-risposta atti a valutare la tossicità dei trattamenti con i peptidi, hanno evidenziato che il trattamento a 30 minuti a concentrazioni fino a 100 μ M non induceva sostanziali variazioni della quantità di LDH prodotto dalle colture. In seguito a trattamenti prolungati fino a 8 h e 24 h si iniziava, invece, ad osservare un lieve ma significativo aumento di LDH e quindi di tossicità sulle colture. In funzione di tali esperimenti abbiamo stabilito concentrazioni ideali non tossiche, a 50 e 100 μ M, per ogni peptide analizzato, con le quali abbiamo trattato le colture di cheratinociti umani per un tempo di 20 minuti.

Abbiamo quindi condotto esperimenti di attivazione recettoriale con i peptidi e dimostrato che solo uno dei peptidi analizzati, il peptide preHA-HA, induceva una lieve, tuttavia non significativa attivazione della cascata molecolare associata all'attivazione del recettore dell'IL-22, valutata in termini di attivazione dello STAT3 e di ERK1/2.

Vista la scarsa o nulla abilità dei suddetti peptidi di funzionare come agonisti, abbiamo valutato se essi potessero avere un'azione antagonista dell'IL-22. Per questi esperimenti, alle colture cheratinocitarie sono stati somministrati i peptidi insieme all'IL-22 ricombinante (3 μ M) per 20 minuti, in un rapporto molare di 1:80-400. Anche in questo caso abbiamo valutato l'attivazione

delle cascate molecolari recettoriali STAT3- ed ERK1/2-dipendenti, potendo osservare che i peptidi avevano una significativa attività antagonista già a dosi 80 volte superiori a quelli della IL-22.

Altri esperimenti saranno condotti per cercare di capire a quali concentrazioni si esplica la funzione agonista o antagonista dei mimetici e se essi riescono a funzionare anche in saggi biologici dove si valutino le loro capacità di contrastare o favorire le funzioni pro-infiammatorie e rigenerative dei cheratinociti.

- DESCRIZIONE STRUTTURA OSPITANTE E RIFERIMENTI TUTOR SCIENTIFICO

Lo studio è stato condotto all'IDI-IRCCS di Roma, che è il più grande ospedale dermatologico in Italia. L'IDI è strutturato in Dipartimenti ed Unità cliniche ed offre una vasta gamma di servizi di assistenza per i pazienti dermatologici, beneficiando, pertanto, di ampio accesso ai campioni biologici dei pazienti. L'IDI è stato qualificato come IRCCS (Istituto per la Ricerca e Cure a Carattere Scientifico) e ha cinque laboratori di ricerca che svolgono studi sperimentali in diversi campi della dermatologia, immunologia e oncologia, in stretta collaborazione con le unità cliniche. In particolare, il Laboratorio di Ricerca di Immunologia Sperimentale, dove si è svolto lo studio, è equipaggiato con gli strumenti e le attrezzature necessarie ed un personale qualificato a disposizione per effettuare tutti gli studi scientifici. Lo studio si è svolto sotto la supervisione della Dott.ssa Cristina Albanesi, ricercatore senior del Laboratorio. La Dott.ssa Albanesi lavora dal 1995 all'IDI e in questi anni ha svolto una serie di programmi di ricerca incentrati sulla comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari alla base di malattie cutanee immuno-mediate, in particolare la psoriasi.