

FIG.1. Coprecipitazione di SAP e di una attività Dgk R59949 sensibile.

Cellule Jurkat A3 (A), Molt-4 (B) e Linfociti periferici (C) mantenuti in RPMI 1640 al 10% siero sono stati lisati ed immunoprecipitati con l'anticorpo policlonale anti-SAP (exalpha). Gli immunoprecipitati sono stati saggiati per l'attività diacilglicerolo cinasica in presenza o meno di R59949 10 μ M.

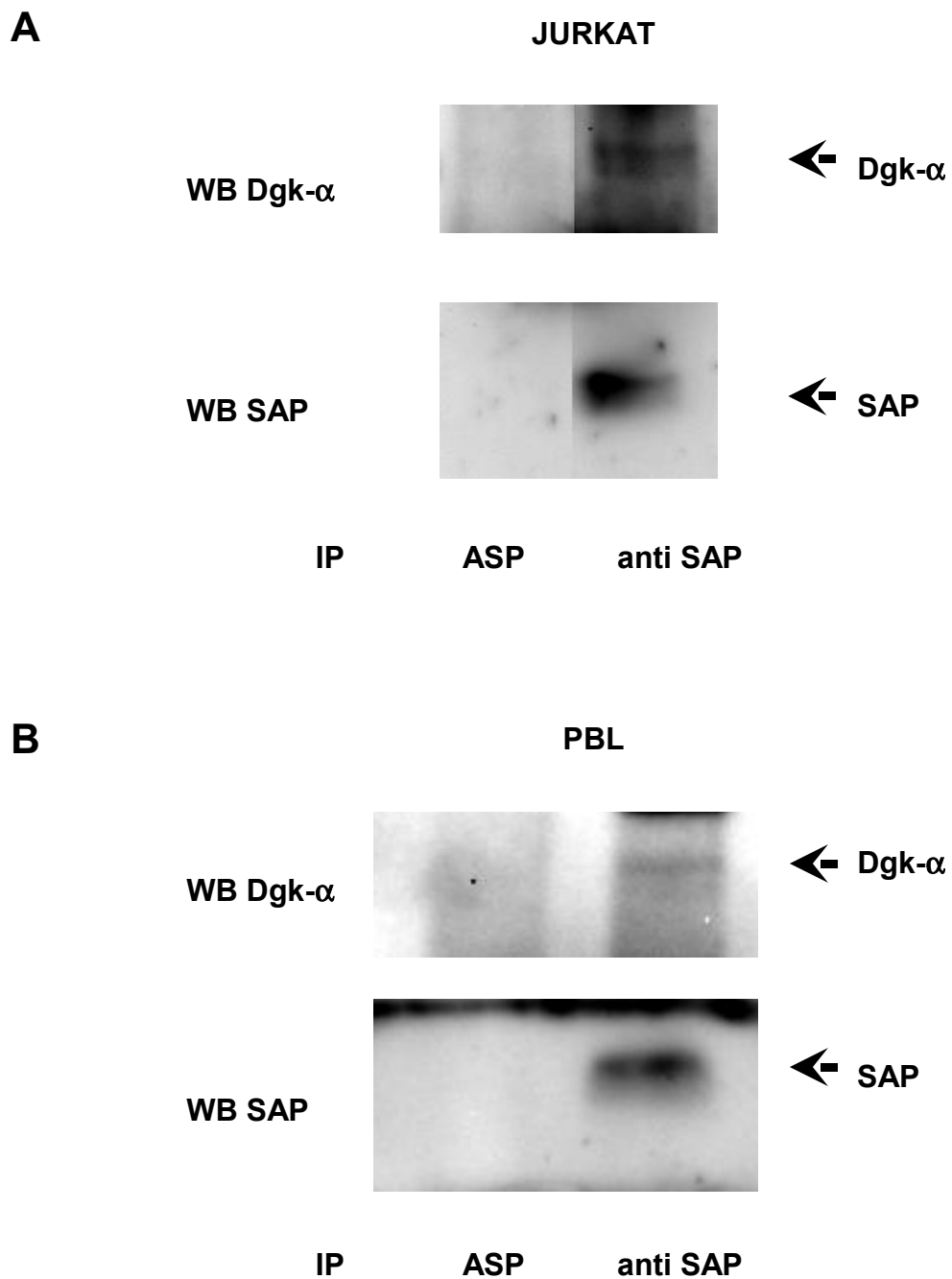


FIG.2. Dgk- α coimmunoprecipita con SAP

Cellule Jurkat A3 (A) e linfociti periferici (B) mantenuti in RPMI 1640 al 10% di siero sono stati lisati ed immunoprecipitati con l' anticorpo monoclonale anti SAP (SAP23.1.5). L'immunoprecipitato è stato denaturato ed analizzato tramite western blot separatamente con anticorpi monoclonali anti Dgk- α e anti SAP (FL-128).

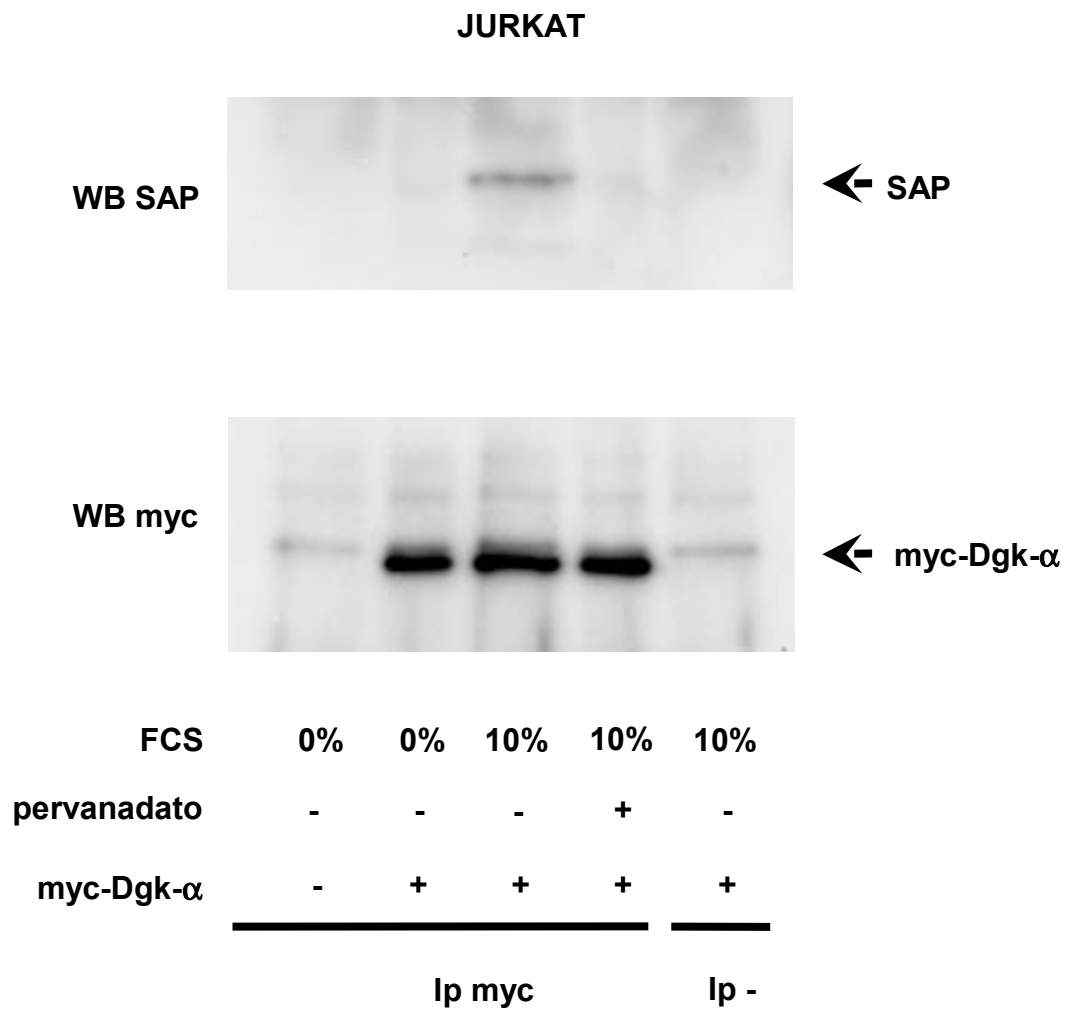


FIG.3. myc-Dgk-α coimmunoprecipita con SAP

Cellule Jurkat A3, trasfettate con myc-Dgk-α, sono state mantenute per 24 ore in RPMI 1640 allo 0% o al 10% di siero; dove indicato le cellule sono state trattate per 15 minuti con pervanadato (3mM H₂O₂, 1mM Na₃VO₄). Le cellule sono state immunoprecipitate con l' anticorpo monoclonale anti-myc (9E10), gli immunoprecipitati sono stati denaturati ed analizzati separatamente con gli anticorpi anti myc (9E10) e anti SAP (FL-128).

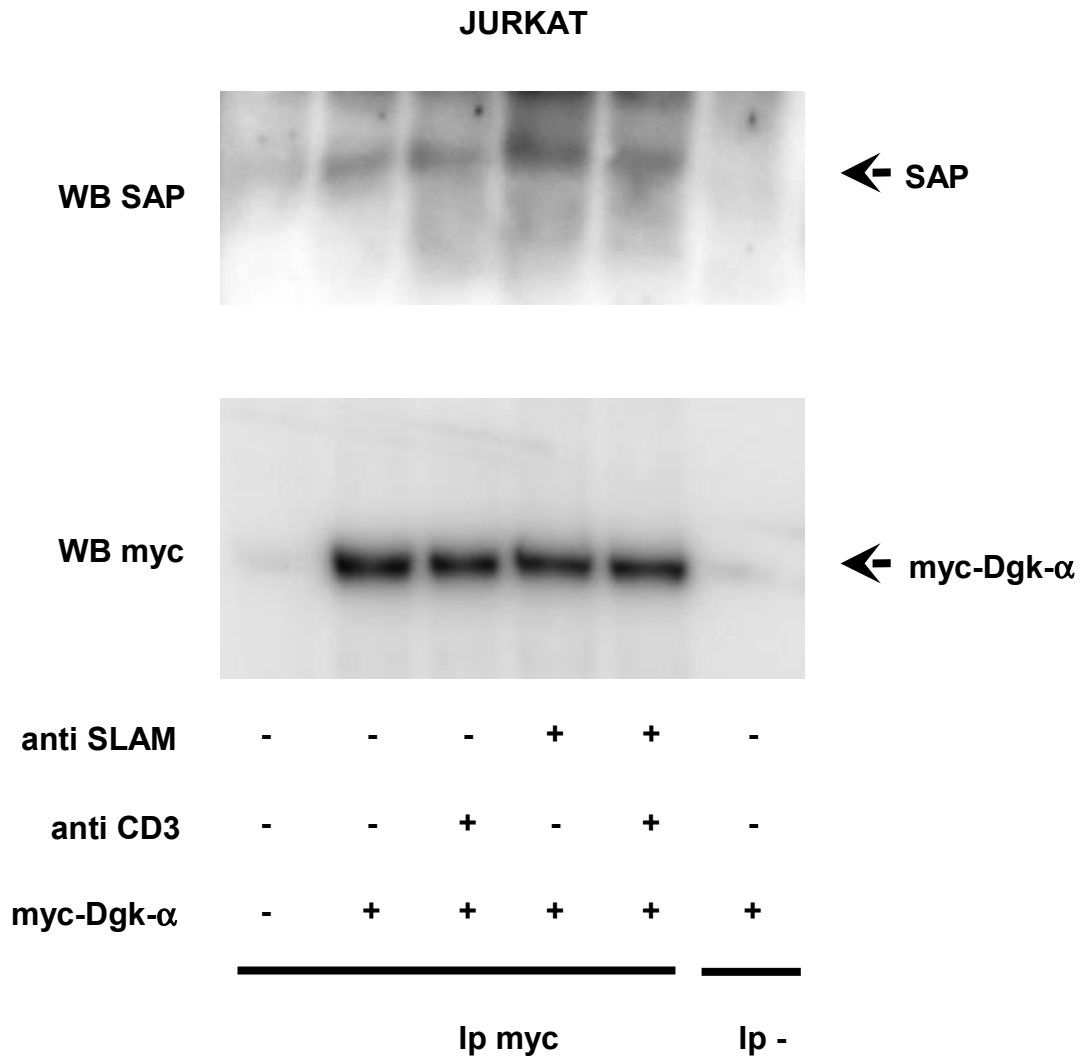


FIG.4. Coimmunoprecipitazione di myc-Dgk- α e SAP in cellule stimulate.

Cellule Jurkat A3, trasfettate con myc-Dgk- α , mantenute in RPMI 1640 al 10% di siero e trattate o meno con 10 μ g/ml di anticorpo anti CD3 (OKT3), anti SLAM (A12) o con entrambi. Le cellule sono state lisate e immunoprecipitate con l' anticorpo monoclonale anti-myc (9E10), gli immunoprecipitati sono stati denaturati ed analizzati separatamente con gli anticorpi anti myc (9E10) e anti SAP (FL-128).

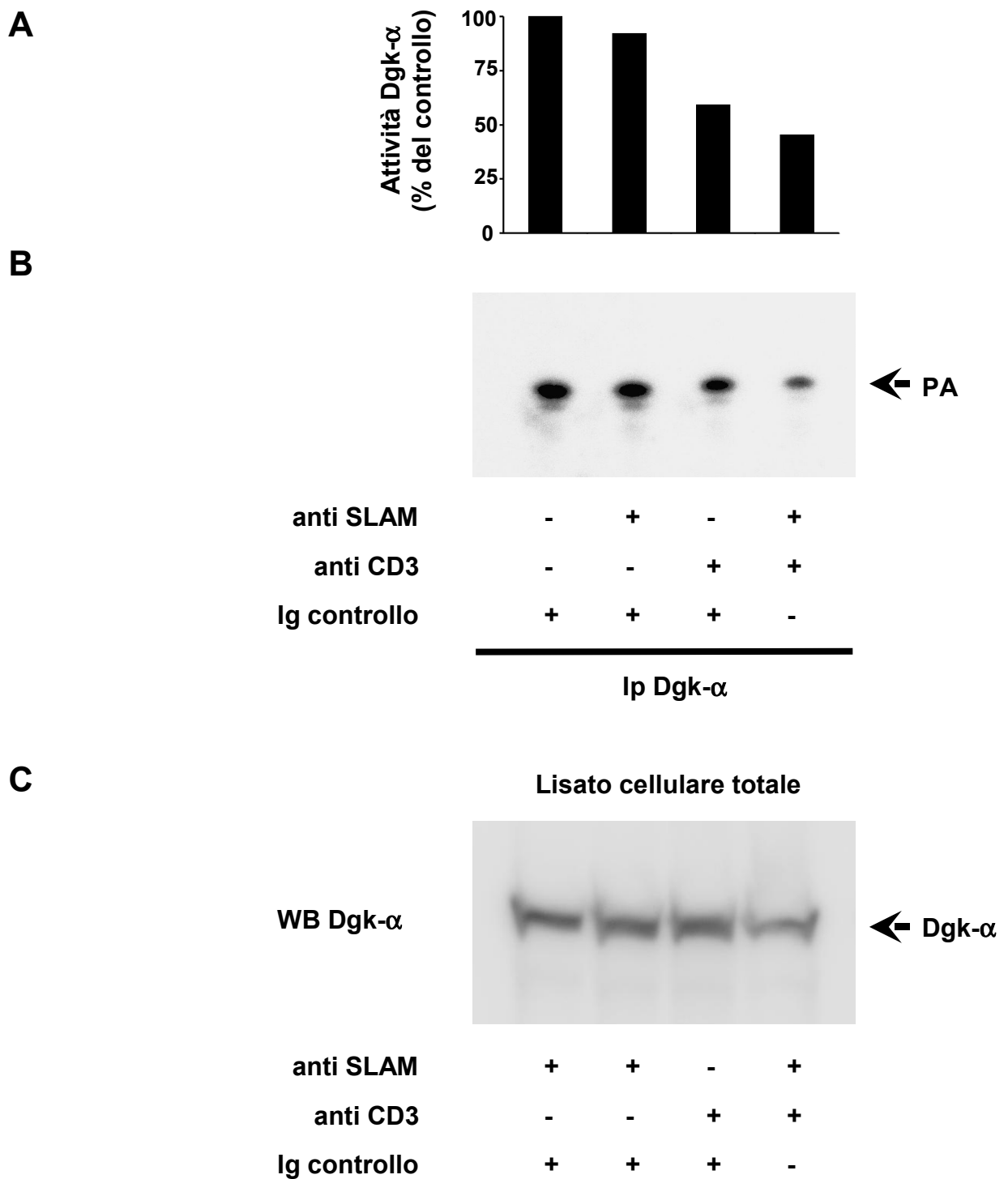


FIG.5. Dgk- α è inibita in cellule Jurkat attivate.

Cellule Jurkat A3 coltivate in RPMI 1640 al 10% di siero e trattate come indicato con 10 μ g/ml di anticorpo anti CD3 (OKT3), anti SLAM (A12) o quantità equivalenti dell'anticorpo di controllo (anti v-Src clone Ab-1). Dopo 15 minuti le cellule sono state lisate ed immunoprecipitate con l' anticorpo monoclonale anti Dgk- α e gli immunoprecipitati sono stati saggiati per l'attività diacilglicerolo cinasica. Una aliquota del lisato totale è stata analizzata in western blot con l'anticorpo anti Dgk- α

(A) Quantificazione dell'attività Dgk da due esperimenti indipendenti.

(B) Dgk assay da un esperimento rappresentativo

(C) Western blot anti Dgk- α dello stesso esperimento

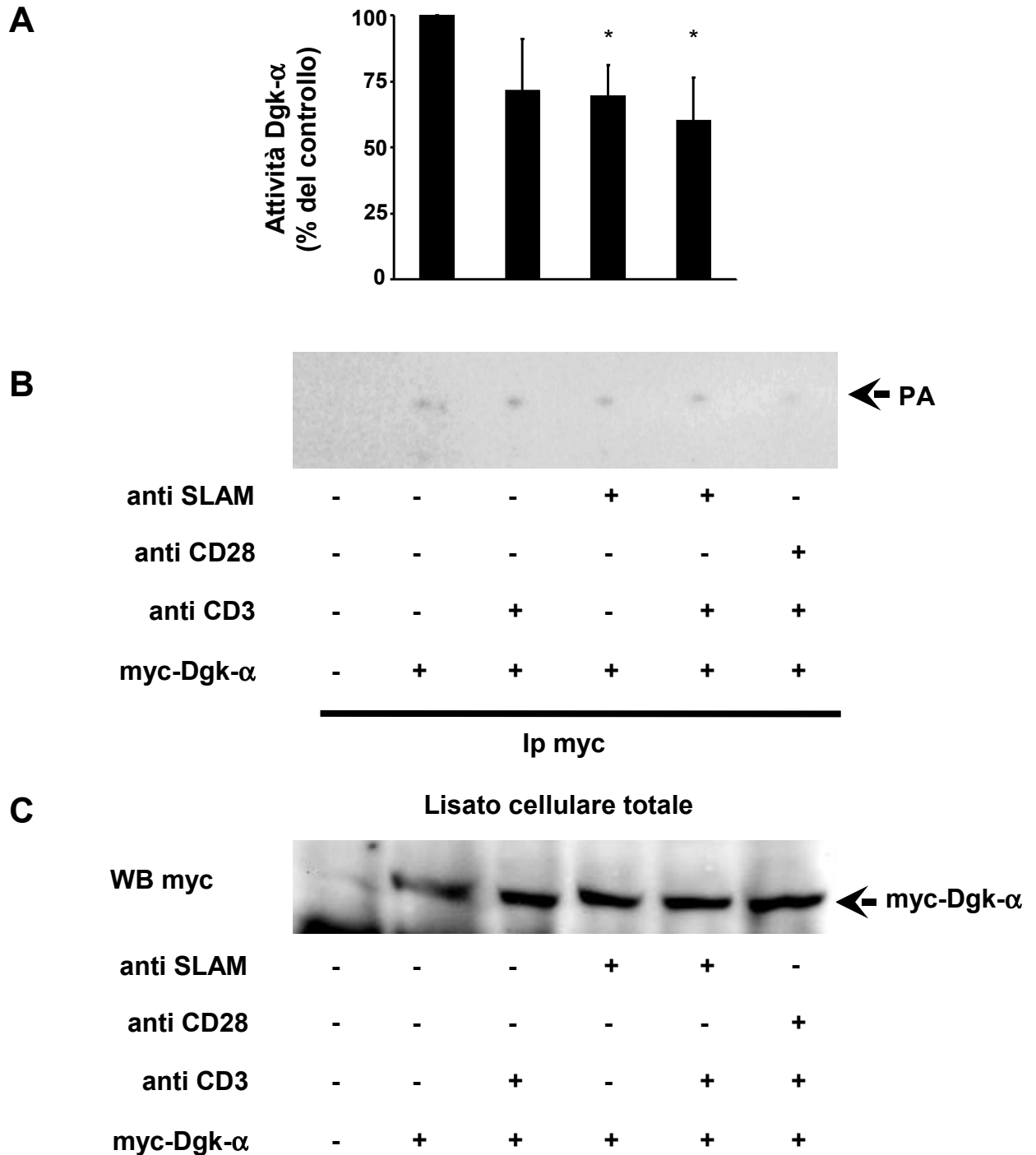


FIG.6. myc-Dgk-α è inibita in cellule Jurkat attivate.

Cellule Jurkat A3, trasfettate con myc-Dgk-α, coltivate in RPMI 1640 al 10% di siero e trattate con 10 µg/ml degli anticorpi agonisti indicati: anti CD3 (OKT3), anti SLAM (A12), anti CD28 (ANC28.1/5D10). Dopo 15 minuti le cellule sono state lisate ed immunoprecipitate con l' anticorpo monoclonale anti myc. Gli immunoprecipitati sono stati saggati per l'attività diacilglicerolo cinasica. Una aliquota del lisato totale è stata analizzata in western blot con l'anticorpo anti myc.

(A) Quantificazione dell'attività Dgk da tre esperimenti indipendenti (media +/- errore standard; * test T p<0,05).

(B) Dgk assay da un esperimento rappresentativo

(C) Western blot anti Dgk-α dello stesso esperimento

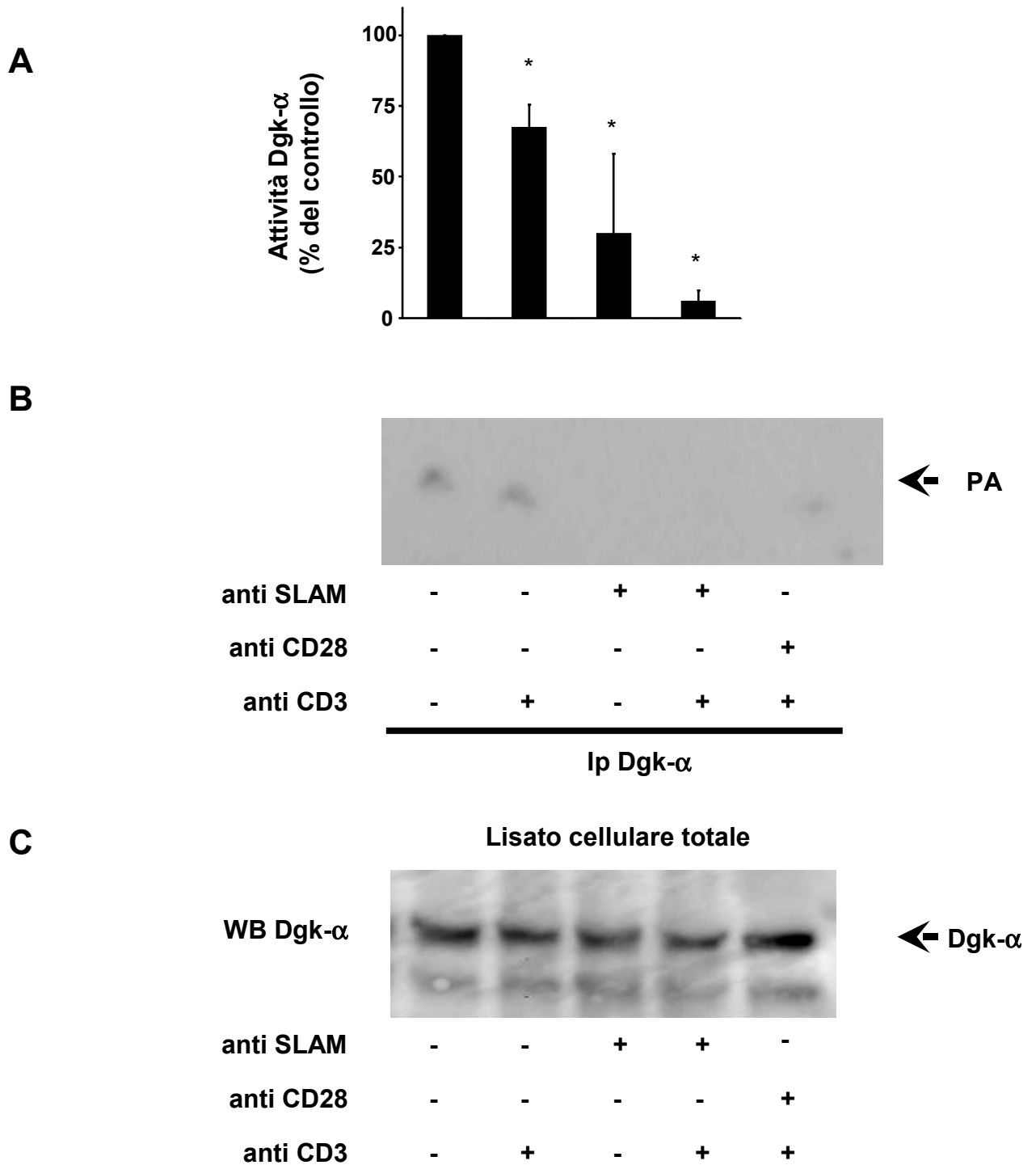


FIG.7. Dgk- α è inibita nei linfociti periferici attivati.

I linfociti periferici mantenuti in RPMI 1640 al 10% di siero e trattati con 10 μ g/ml degli anticorpi agonisti indicati: anti CD3 (OKT3), anti SLAM (A12), anti CD28 (ANC28.1/5D10). Dopo 15 minuti le cellule sono state lisate ed immunoprecipitate con l' anticorpo monoclonale anti DGK- α . Gli immunoprecipitati sono stati saggiati per l'attività diacilglicerolo cinasica. Una aliquota del lisato totale è stata analizzata in western blot con l'anticorpo anti Dgk- α .

(A) Quantificazione dell'attività Dgk da tre esperimenti indipendenti (media \pm errore standard; * test T $p < 0,05$).

(B) Dgk assay da un esperimento rappresentativo

(C) Western blot anti Dgk- α dello stesso esperimento

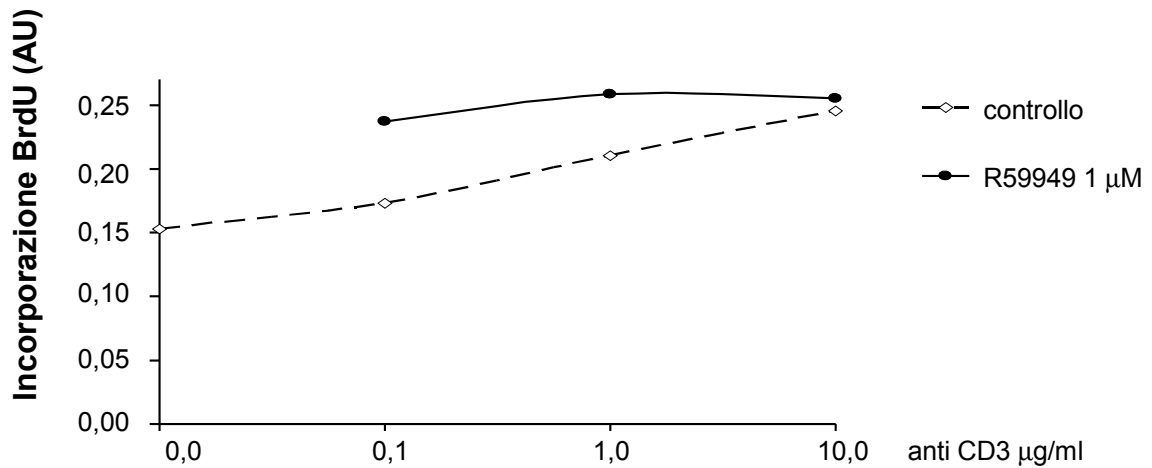
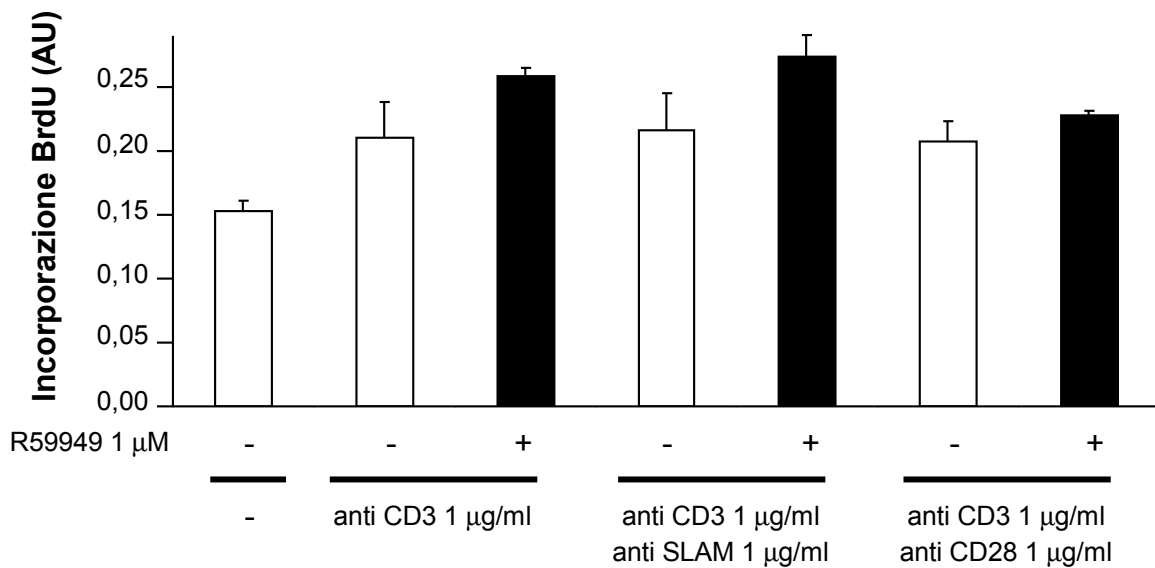
A**B**

FIG.8. L'inibizione di DGK- α promuove la proliferazione di cellule Jurkat A3.

Incorporazione di BrdU in cellule Jurkat A3 coltivate per 72 ore in assenza di siero con o senza R59949 1 μ M e degli anticorpi agonisti indicati.

I dati sono media +/- deviazione standard di triplicati

(A) Dose risposta in presenza di dosi crescenti di anti CD3 (OKT3).

(B) Incorporazione di BrdU in presenza delle combinazioni indicate di anti CD3

(OKT3), anti SLAM (A12), anti CD28 (ANC28.1/5D10).

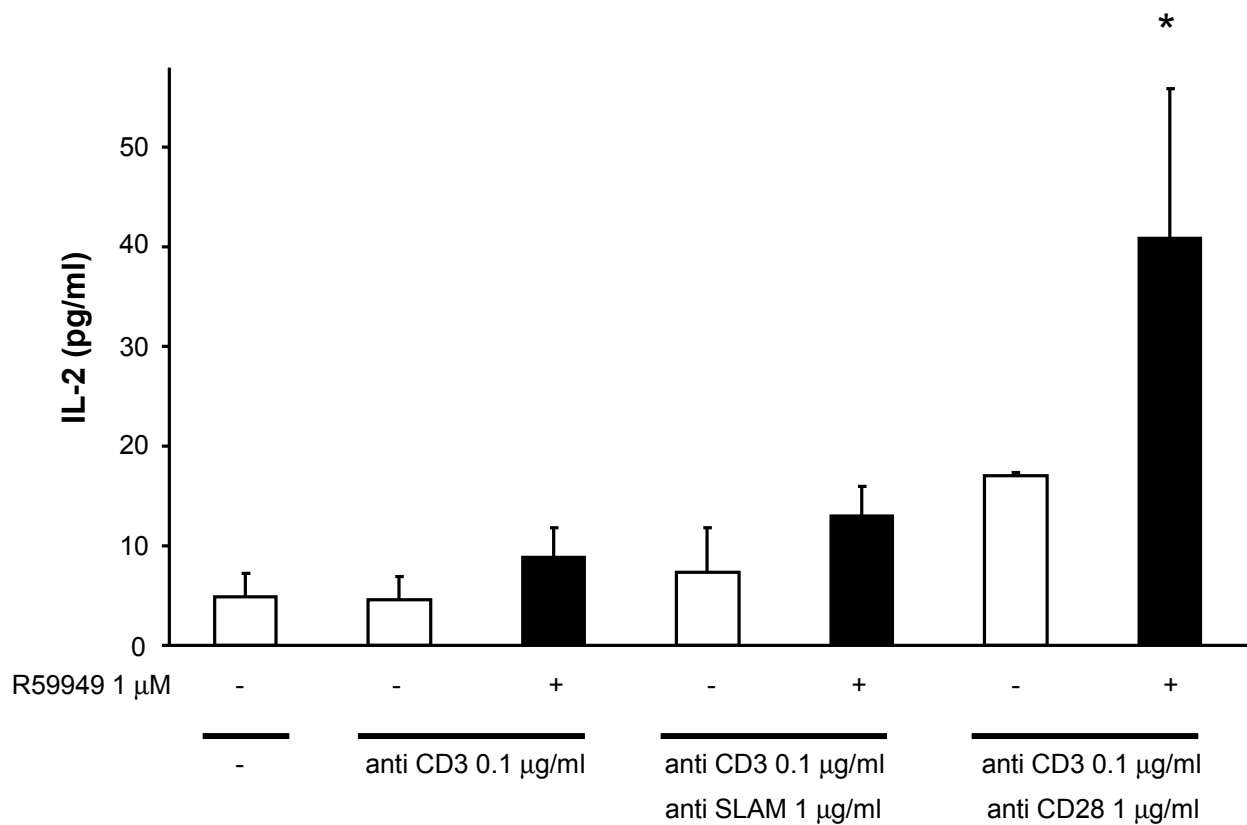


FIG.9. R59949 1 μM promuove la sintesi di IL-2 in cellule attivate

Cellule Jurkat A3 mantenute in assenza di siero con o senza R59949 1μM ed in presenza delle combinazioni indicate di anti CD3 (OKT3), anti SLAM (A12), anti CD28 (ANC28.1/5D10). Dopo 72 ore il contenuto di IL-2 nel mezzo di coltura è stato misurato con metodica ELISA.

I dati sono media +/- deviazione standard di triplicati