

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare *Ciclo XXI*

Relazione 2° anno

TITOLO:

**Ruolo della proteina Gas6 nella modulazione
dell'infiammazione**

Candidato: dott.sa Federica Alciato

Tutor: Prof. Gian Carlo Avanzi

SEZIONE 1
RISULTATI SCIENTIFICI
INTRODUZIONE

GAS6 (Growth Arrest Specific 6)

E' una proteina secreta di 76 KDa codificata da un gene di 2556 nucleotidi clonato nell'uomo nel 1993 ma studiato in fibroblasti murini fin dal 1988. Il suo nome deriva dal fatto che la sua espressione è stata inizialmente riscontrata soltanto in cellule in fase G₀ (Schneider et al., 1988). La sua struttura cristallografica non è ancora stata completamente determinata, ma studi ultrastrutturali suggeriscono per la proteina Gas6 un'impostazione multimodulare, con un dominio N-terminale γ -carbossiglutammino, una regione centrale caratterizzata da sequenze ripetute EGF-like e una regione C-terminale globulare SHBG-like. Con il passare degli anni, lo studio di Gas6 si è spinto ben oltre i fibroblasti murini, infatti, l'espressione proteica, o anche soltanto la presenza dell'mRNA è stata riscontrata in molti altri tessuti sia murini sia umani. (*Tabella 1*)

	TOPO	UOMO
mRNA	Cuore Polmone Epitelio gastrico Rene SNC Cellule del Sertoli Cellule del Leydig Cheratinociti	Polmone Epitelio intestinale Midollo osseo Cellule endoteliali
PROTEINA	Cellule endoteliali Cellule del Sertoli Cellule del Leydig SNC VSMCs	HUVECs VSMCs Endotelio Piastrine Tessuto ematopoietico fibroblasti

Tabella 1. Panorama sull'espressione dell'mRNA e della proteina Gas6 (Avanzi et al., 1998; Avanzi et al., 1999; Lu et al., 1999; Manfioletti et al., 1993; Mark et al., 1994; Melaragno et al., 1998; Nakano et al., 1995; O'Donnel et al., 1999; Prieto et al., 1999)

L'azione di Gas6 è possibile soltanto se sono presenti la vitamina K, che media la carbossilazione sulla porzione N-terminale, e il calcio (Manfioletti et al., 1993) ed è mediata dai recettori Axl,

Tyros3 e Mer, che hanno diversa affinità per il proprio ligando. In particolare Mer è presente in cellule mononucleate del sangue periferico e midollare, nei monociti ed in linee neoplastiche a cellule B e T (Graham et al., 1994).

Le funzioni di Gas6 fin'ora evidenziate sono:

- *antiapoptotico*: il fatto che questa proteina fosse espressa durante la fase di quiescenza della cellula, ha fatto inizialmente supporre che il suo ruolo potesse essere legato alla regolazione della proliferazione e/o della sopravvivenza cellulari (Schenider et al., 1978). È stato dimostrato che Gas6 *in vitro* induce la proliferazione e promuove la sopravvivenza di fibroblasti murini della linea NIH-3T3 (Goruppi et al., 1996) e li protegge dall'apoptosi indotta dalla deprivazione di siero o dall'aggiunta di TNF- α (Bellosta et al., 1997). Inoltre aumenta la proliferazione indotta da trombina, angiotensina II, acido lisofosfatidico, promuove la sopravvivenza e favorisce la chemiotassi in cellule muscolari lisce vasali (Fridell et al., 1998; Nakano et al., 1997), ed infine induce la proliferazione e protegge dall'apoptosi le cellule di Schwann (Li et al., 1996). Gas6 non ha alcun effetto sulla crescita o la sopravvivenza di fibroblasti umani, cellule endoteliali e stromali, e precursori emopoietici umani (Avanzi et al., 1997). Protegge dall'apoptosi le cellule HUVEC umane (Human Umbelical Vein Endotelial Cells) *in vitro*, sia deprivate dei fattori di crescita sia pretrattate con TNF- α . Tale effetto è evocato con l'aggiunta di Gas6 esogeno direttamente alle piastre di coltura: la produzione autocrina, infatti, non è sufficiente a determinare tale effetto e in ambedue i casi, le cellule sono bloccate in fase G1 (Melaragno et al., 1998).
- *mediatore dell'aggregazione tra cellule*: è stata evidenziata l'abilità del recettore murino analogo di Axl, denominato Ark, di mediare l'aggregazione cellulare grazie ad un legame omofilico/omotipico (Bellosta et al., 1995). Successivamente, è stato dimostrato che anche in una linea cellulare megacariocitica umana, denominata M07, in seguito a transfezione con Axl (M07-Axl), si formano aggregati di discrete dimensioni, cosa che non succede con le cellule parentali. Ciò fa supporre che questo fenomeno sia mediato dall'interazione tra le diverse molecole di recettori Axl presenti sulla superficie cellulare (Avanzi et al., 1998). A supporto di questa interpretazione c'è anche l'osservazione che l'esposizione delle M07-Axl al Gas6 determina la riduzione degli aggregati (Avanzi et al., 1998). L'ipotesi che l'interazione Gas6-Axl potesse avere un ruolo nei complessi meccanismi che regolano l'adesione cellulare è stata confermata anche da studi volti ad indagare il ruolo del sistema Gas6-Axl nell'interazione polimorfonucleati (PMN)-cellule endoteliali: è stato dimostrato che Gas6 inibisce l'adesione dei PMN all'endotelio attivato dal fattore di attivazione piastrinica (PAF), dalla trombina, dall'interleuchina 1 β (IL-1 β), dal fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), e dal forbolo 12-miristilato 13-acetato (PMA). Di contro non influenza

l'adesione dei PMN all'endotelio inattivo o stimolato da n-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) e da interleuchina-8 (IL-8) (Avanzi et al., 1998). Gas6 è quindi una molecola antiadesiva che agisce prevalentemente sull'endotelio.

- *regolatore del processo angiogenetico*: Gas6 inibisce la tubuligenesi, la migrazione e lo «sprouting» delle cellule endoteliali VEGF-mediata in saggi su matrigel a varie concentrazioni con effetto massimo a 100-200 ng/ml. Inoltre Gas6 inibisce la neoangiogenesi VEGF-mediata nel modello sperimentale dell'embrione di pollo (Gallicchio et al., 2005) e quella VEGF ma non FGF mediata nel modello di matrigel plugs.
- *induttore della proliferazione mesangiale*: Gas6 induce un aumento della proliferazione delle cellule mesangiali attraverso il legame con il suo recettore Axl espresso sulla superficie cellulare dei glomeruli *in vitro* (Yanagita et al., 2001). Questo ruolo della proteina Gas6 sulla progressione del danno glomerulare, è stato confermato anche in vivo in un modello di glomerulonefrite nel topo, in cui si è verificato che la proliferazione delle cellule glomerulari, la glomerulosclerosi e la deposizione di fibrinogeno nei glomeruli erano ridotte dall'assenza di Gas6 (Yanagita et al., 2002).
- *regolatore del processo di emostasi*: In questo senso, pare abbiano un ruolo preminente i recettori Axl e Tyro3/Rse. La proteina Gas6 interviene nell'aggregazione piastrinica e nella formazione del trombo. Infatti, l'inattivazione del gene Gas6 nel topo knock-out (Gas6^{-/-}) previene la trombosi venosa e la tromboembolia polmonare rappresentando un fattore protettivo dall'induzione della tromboembolia da infusione di collagene/epinefrina, fatale nei topi wild type. Tale effetto protettivo è riproducibile nel topo wild type mediante la somministrazione di anticorpo anti-Gas6. Tale fenomeno è stato confermato anche nei topi knock-out per i recettori tirosin-chinasici di Gas6, infatti, la mancanza di tutti i recettori o anche di uno solo di essi comporta i medesimi effetti protettivi descritti per l'inattivazione del ligando. L'emostasi di tali animali tuttavia non è compromessa, non sono stati infatti osservati sanguinamenti spontanei nei topi Gas6^{-/-}. La proteina Gas6 sembrerebbe quindi intervenire nella stabilizzazione e non nella formazione del trombo piastrinico rappresentando probabilmente un segnale di amplificazione dell'aggregazione piastrinica (Angelillo-Sherrer et al., 2001; Angelillo-Sherrer et al., 2005).

GAS6 E INFIAMMAZIONE

Un altro campo in cui la proteina Gas6 è stata studiata è l'infiammazione. Sono stati creati topi knock out per ognuno dei singoli recettori oltre ad un triplo mutante (TAM) ed è stato possibile osservare una notevole discrepanza, rispetto al non mutato, del mutante Mer. I topi con questo

genotipo sono caratterizzati da retinite pigmentosa e cecità (D’Cruz et al., 2000; Gal et al., 2000) aumentata sensibilità all’LPS e conseguente shock endotossico, e una ritardata clearance delle cellule apoptotiche (Camenish et al., 1999; Cohen et al., 2002; Scott et al., 2001). E’ stato inoltre dimostrato che una mutazione del gene per il recettore umano Mer è associata ad un aumento di incidenza di retinite pigmentosa nell’uomo (Thompson et al., 2002).

Tuttavia il disordine più drammatico riguarda i topi TAM ed è a carico del sistema immunitario (Lu et al., 2001). Alla nascita questi animali presentano organi linfatici periferici di normale peso e misura, e le linee cellulari linfoide e mieloidi non sono diverse da quelle dei topi wild. Anche se milza e linfonodi iniziano a crescere già dalla quarta settimana di vita, questi raggiungono dimensioni abnormi all’incirca intorno al sesto mese, entro un anno la milza dei topi TAM è dieci volte quella dei topi wild e la linfadenopatia è pronunciata e diffusa. Ciascuno dei tre recettori della famiglia contribuisce a tale fenomeno, ma è Mer quello che ha un peso maggiore (Lu et al., 2001). Una caratteristica classica dei topi TAM, è quella della proliferazione aberrante dei linfociti T e B, con un rapporto T/B e $CD4^+/CD8^+$ aumentato (Lu et al., 2001). L’elevato numero dei linfociti conduce al superamento della capacità del compartimento rappresentato dagli organi linfatici periferici, e quindi esita nell’invasione tissutale che si manifesta con la presenza di queste cellule pressoché in tutti gli organi (Lu et al., 2001). Inoltre, i linfociti, come tutte le cellule del sistema immunitario, sono in continua fase di attivazione come dimostrato dall’elevata espressione di marcatori della risposta acuta e cronica. L’attivazione costitutiva del sistema immunitario e la degenerazione di diversi tessuti non immunitari conduce allo sviluppo dell’ampio spettro delle manifestazioni autoimmuni dei topi TAM, le quali sono sovrapponibili alle più comuni malattie autoimmunitarie dell’uomo: artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico, sindrome di Sjögren e pemfigo volgare (Lu et al., 2001; Lemke et al., 2003). Anche se i linfociti, in questi mutanti, sono iperattivi, iperproliferanti e vanno a formare colonie nei tessuti non linfatici, non esprimono i recettori Tyro 3, Axl e Mer, che sono invece espressi caratteristicamente da monociti, macrofagi e cellule dendritiche (Lemke et al., 2003). Sono due le caratteristiche fondamentali dell’azione che i recettori Tyro 3, Axl e Mer esercitano sui monociti-macrofagi ad essere alla base delle manifestazioni disimmunitarie dei mutanti TAM. La prima è rappresentata dal fatto che questi recettori, quando attivati, sembrano essere in grado di inibire l’attivazione dei monociti-macrofagi susseguente ad uno stimolo. La seconda caratteristica fondamentale che contribuisce a formare il quadro clinico dei mutanti, è rappresentata dall’alterazione della fagocitosi e viene riscontrata principalmente nei mutanti Mer.

Il meccanismo di trasduzione del segnale attraverso il quale lo stato di attivazione dei monociti-macrofagi può essere alterato dal legame tra Gas6 e i propri recettori è tuttora oggetto di studio. In che modo questi recettori agiscano sulla fisiologia del macrofago, non è completamente chiarito.

Pare che il processo non si inserisca completamente all'inizio di una risposta immunitaria. Cioè, l'attivazione dei recettori dovrebbe essere un evento successivo all'attivazione a cui i monociti-macrofagi vanno incontro all'inizio di una risposta. Inoltre queste cellule sono quasi sicuramente capaci di una stimolazione autocrina, per la coespressione dei recettori e dei propri ligandi. C'è poi la possibilità che i livelli dei ligandi siano regolati in funzione dello stato di attivazione dei macrofagi, e sono quindi incrementati dopo l'inizio di una risposta immune (Lemke et al., 2003).

Recenti studi hanno ulteriormente approfondito il meccanismo tramite cui la mancanza di uno o più recettori di Gas6 possa determinare l'attivazione macrofagica. Recentemente è stato dimostrato che le cellule apoptotiche inibiscono la produzione di citochine proinfiammatorie da parte delle cellule dendritiche tramite l'attivazione di Mer. Mer quindi attiverebbe il sistema PI3K/AKT determinando in ultimo l'inibizione dell'IKK (chinasi di IκB), inibendo la liberazione di NFκB dal complesso con IκB e quindi inibendone la sua traslocazione nel nucleo con conseguente attivazione di trascrizione di geni di citochine proinfiammatorie tra cui il TNF-α (Sen et al., 2006).

MONOCITI-MACROFAGI

I monociti sono cellule di 20 μm di diametro, presentano un grosso nucleo eccentrico con aspetto a ferro di cavallo all'esame microscopico. Permangono in circolo per 1-3 giorni costituendo nell'individuo sano il 2-10% dei leucociti circolanti e quindi extravasano nei tessuti dove si trasformano in macrofagi tissutali. Si localizzano nel tessuto connettivale, nei linfonodi, nella milza, nel midollo osseo, nel peritoneo, nella sinovia, nel polmone (macrofagi alveolari), nel fegato (cellule di Kupffer), nell'osso (osteoclasti) e nel SNC (microglia).

Nel loro insieme, queste cellule prendono la denominazione di MPS (mononuclear phagocytic system) o sistema fagocitico mononucleare. I monociti presentano una serie di recettori responsabili della loro attivazione. Questi sono: lectina microbica; frammento Fc di IgG e IgE; fattori complementari (recettori CR1 per C3b); lipopolisaccaride batterico (LPS) e le molecole di adesione. I monociti-macrofagi sono efficaci cellule fagocitiche ed essendo cellule non terminali in grado di proliferare possono garantire la loro persistenza nella sede del focolaio flogistico (anche cronico). Alcuni vengono eliminati, nel corso del processo infiammatorio, per l'azione citotossica di sostanze liberate dai macrofagi stessi o prodotte da batteri o da altre cellule. La rimozione dei macrofagi alla fine del processo infiammatorio avviene quasi sempre per apoptosi da ridotta produzione di fattori di crescita (GFW, growth factor withdrawal).

I macrofagi naturalmente intervengono come modulatori della flogosi rilasciando le citochine immunoregolatrici. Inoltre i macrofagi sono cellule presentanti l'antigene (APC) sulle molecole del

complesso maggiore di istocompatibilità (MCH) di classe II intervenendo quindi nel riconoscimento della noxa e nella conseguente attivazione del sistema immunitario. Inoltre tutti i fagociti (monociti-macrofagi, e granulociti polimorfonucleati neutrofilii) sono in grado di riconoscere componenti batteriche opsonizzate attraverso i propri recettori per il complemento e i propri recettori Fc (Frank et al., 1991).

Quindi i monociti-macrofagi costituiscono la prima linea di difesa all'invasione microbica rappresentando le cellule principali nella risposta ai batteri (Moore et al., 1976) e integrandosi con ruoli molteplici in ogni processo flogistico.

Il riconoscimento di LPS da parte di queste cellule innesca una cascata di eventi che porta alla produzione e allo stoccaggio intracellulare di radicali dell'ossigeno e di altri agenti microbici, nonché alla secrezione di diversi mediatori infiammatori chiave (tra questi per primi spiccano il TNF- α , l'IL-6 e l'IL-1) (Hiemstra et al., 1993; Mayer et al., 1991; Roitt, 1994). Queste citochine non sono espresse costitutivamente dai fagociti mononucleati, infatti i loro mRNA sono trascritti solo durante l'attivazione e i loro livelli massimi sono riscontrabili circa 40 minuti dopo l'insulto (Grewe et al., 1994; Luster et al., 1994). Si evince quindi che i macrofagi rappresentano la cellula fondamentale della difesa di prima linea, rispondendo alla presenza dei microbi o di loro componenti con lo scopo di eradicare l'infezione eliminando l'agente infettante (fagocitosi e lisi), e di evitare quindi la diffusione dei microbi o dei loro componenti in altri tessuti. L'uccisione dei microrganismi fagocitati avviene per azione dei radicali dell'ossigeno e di altri agenti microbici (Bautista et al., 1991; Meyer et al., 1994), che sono le ultime sostanze prodotte nel fenomeno dell'attivazione. Ad alte concentrazioni di attivatori però tali molecole vengono riversate nei tessuti danneggiandoli. Tra queste si ricorda l'ossido nitrico (NO), che una volta secreto viene presto convertito da nitrato a nitrito, e che oltre alla sua azione (benefica) microbicida, causa vasodilatazione e danno endoteliale (Wang et al., 1998).

Nel 1990 è stato individuato il recettore responsabile dell'attivazione dei monociti-macrofagi in presenza di LPS: CD 14, prima conosciuto solo come un recettore monocita-specifico (Vreugdenhil et al., 2001). Tuttavia la struttura di questo recettore e la mancanza di un dominio intracellulare capace di produrre un segnale intracellulare ha fatto supporre l'ipotesi di altri recettori coinvolti. Questi sono la famiglia dei Toll-like receptors (TLR) (Poltorak et al., 1998).

Pare che un importante ruolo nell'interazione CD14-LPS sia anche attribuibile alle Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP). È stato evidenziato "in vivo" che il LPS è per la maggior parte complessato a proteine LBP (Ramadori et al., 1990; Tobias et al., 1986). LBP è compresa nelle proteine di fase acuta e la sua produzione da parte di fegato, polmone, reni e cuore è indotta da IL-6 e IL-1 (Ramadori et al., 1990, Grube et al., 1994, Wan et al., 1995). I livelli

costitutivi di LBP nel siero sono bassi (1-15 $\mu\text{g/ml}$), ma aumentano molto nella fase acuta dell'inflammazione; negli esseri umani dopo trauma o sepsi, i livelli di picco si riscontrano in seconda o terza giornata dall'evento (Schumann et al., 1999). Il sito specifico di legame tra LBP e il lipide A (componente dell'LPS) risulta nel tratto N-terminale, tra gli aminoacidi 91 e 108, attraverso le cariche positive dei residui di lisina e arginina (Lamping et al., 1996; Pereira et al., 1996), la parte C-terminale invece media il legame tra CD14 e LPS affinché quest'ultimo sia riconosciuto dai monociti-macrofagi e ne inneschi quindi l'attivazione (Han et al., 1994; Theofan et al., 1994). Inoltre LBP catalizza il legame tra LPS e CD 14 aumentando così l'attivazione dei monociti-macrofagi da 100 a 1000 volte (Wang et al., 1998), e portando ad un marcato aumento della produzione di $\text{TNF-}\alpha$ e NO da parte degli stessi (Corradin et al., 1992). L'interazione tra LPS e CD 14, e la mediazione di LBP sono mostrate nella Figura 1.

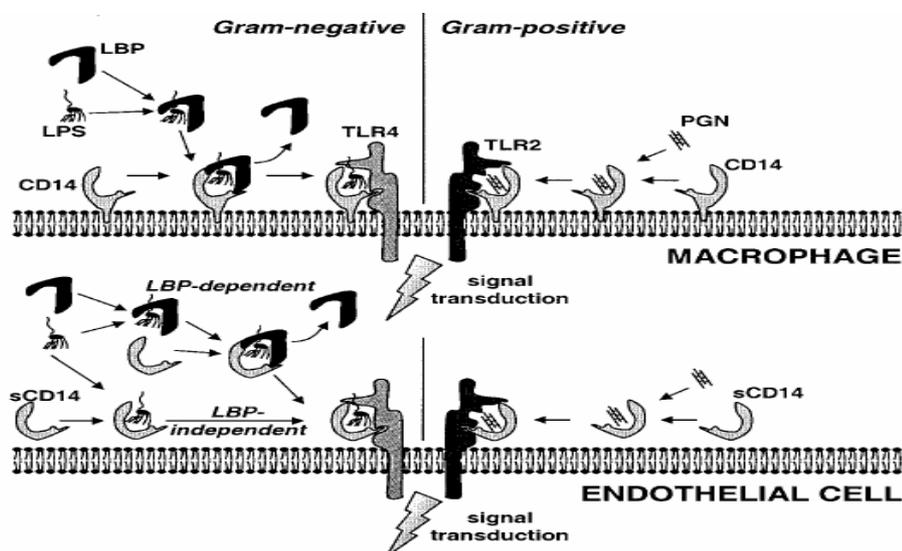


Figura 1. La figura illustra il legame di LPS con CD14 e la mediazione di LBP sui macrofagi. Viene inoltre mostrata l'interazione tra LPS e cellule endoteliali LBP-dipendente.

Il ruolo di CD 14 si conferma determinante in esperimenti condotti su topi transfettati con il gene per CD 14 umano, che si sono dimostrati più sensibili all'insulto da LPS, rispetto ai ceppi "wild"(Ferrero et al., 1993). Inoltre in alcuni studi condotti su conigli trattati con LPS, previa somministrazione di anticorpi anti-CD 14, si riscontra che gli animali che hanno ricevuto gli anticorpi sono protetti dall'ipotensione, il danno d'organo e la secrezione di $\text{TNF-}\alpha$ indotti da LPS (Leturcq et al., 1996). Tuttavia pare che CD 14 abbia un'importanza minore nelle infezioni da Gram-positivi in vivo (Haziot et al., 1999). Il legame tra LPS e CD 14 non causa un'attivazione cellulare immediata, è stata osservata una latenza di 15-30 minuti dal legame LPS/CD 14 alla

secrezione di TNF- α (Lichtman et al., 1998). Un intervallo temporale simile è compatibile con un processo intercorrente lento, come l'internalizzazione. Questa ipotesi sembra sia confermata da studi nei quali il blocco dell'internalizzazione o della fusione dell'endosoma si accompagna all'inibizione della risposta LPS-indotta (Pollack et al., 1997; Poussin et al., 1998). Benché i meccanismi non siano completamente chiariti, pare che LPS in forma monomericata sia trasportato al complesso di Golgi, e questo sarebbe indispensabile per l'attivazione, e LPS in forma particolata o aggregata sia invece portato ai lisosomi senza attivare la cellula (Ferrero et al., 1990).

Siccome CD 14 è un recettore glicosilfosfatidilinositolo-correlato, privo di un tratto transmembrana, come precedentemente descritto necessita di una molecola accessoria per la trasduzione del segnale (Poltorak et al., 1998, Stefanova et al., 1991). Questa ipotesi è stata confermata utilizzando tipi differenti di anticorpi anti-CD 14, i quali bloccando o meno il legame tra LPS e recettore, risultavano comunque inibenti l'attivazione macrofagica LPS-indotta (Gegner et al., 1995). Il recettore accessorio è stato identificato come un membro della famiglia di TLR.

Fino ad ora sono stati identificati recettori Toll-like da TLR1 a TLR10, e sembrano tutti coinvolti nell'attivazione dei monociti-macrofagi e di conseguenza coinvolti nel processo infiammatorio. Questi ed altri recettori rientrano nella superfamiglia TIR, così chiamata in quanto comprende molecole che presentano un'impressionante somiglianza con Toll/IL-1 receptor domain (TIR). Possono poi essere identificati tre gruppi all'interno della superfamiglia: 1) *immunoglobulin domain subgroup* che comprende IL-1RI e IL-18R; 2) *leucine-rich-repeat subgroup* che comprende il TLRs; 3) *adaptor subgroup* che include la proteina MyD88, componente essenziale per la mediazione del segnale di TLR2 e TLR4 (Bowie e O'Neill, 2000). L'attivazione dei monociti-macrofagi appare comunque dipendente da CD 14 (quella delle cellule endoteliali ed epiteliali invece, da sCD14). Inoltre, più recentemente si è scoperto che LPS e macrofago interagiscono prima attraverso CD 14, e successivamente con i TLR.

Non è ancora del tutto chiara la cascata del segnale a valle dei TLR attivata dal legame con LPS. Si è visto che LPS attiva TLR4 e media la produzione di citochine infiammatorie, quali IL-6 e TNF- α , tramite una via mediata dalle proteine TRAF, TRAK, NIK e IKK che fosforila I κ B liberando e permettendo la migrazione nel nucleo del fattore di trascrizione NF κ B (Miggin et al., 2006). È stata però studiata un'altra via, forse attivata da TLR2, mediata da AKT e GSK3 β , proteina che funzionerebbe a switch, attivando inizialmente NF κ B, con produzione di citochine infiammatorie, e più tardivamente CREB e AP1, con produzione di citochine anti infiammatorie, quali IL-10, a scopo di regolare la risposta immunitaria (Martin et al., 2005; Pengal et al., 2006).

LINEA CELLULARE U-937

La linea cellulare U937 è derivata da cellule neoplastiche estratte dall'essudato pleurico di un paziente, di 37 anni, affetto da linfoma istiocitico nel 1976. Morfologicamente queste cellule presentano una forma tondeggianti con piccole sporgenze citoplasmatiche. Il diametro medio è di 12,5µm (range 8,1-16,9 µm). Fissate e colorate, le cellule mostrano una moderata quantità di citoplasma (similitudine con i linfociti prima della blastizzazione) contenente piccoli granuli eosinofili e alcuni vacuoli. Il nucleo ha forma variabile e occasionalmente è possibile osservare uno o due grandi nucleoli. La cromatina è spesso grossolanamente granulosa (Sundström and Nilsson, 1976).

L'origine istocitaria della linea cellulare è confermata dalla capacità delle cellule U937 di produrre lisozimi, di svolgere attività esterasica e anche dalla assente produzione di immunoglobuline. La linea cellulare U937 si duplica "in vitro" mantenendo una distribuzione a singola cellula, anche se nelle colture esiste una tendenza a formare piccoli aggregati cellulari che però si risolvono facilmente per semplice agitazione. La cinetica di crescita (come raddoppiamento cellulare) è in funzione della concentrazione del siero fetale bovino (comunemente usato nelle colture cellulari) che mostra un valore ottimale intorno al 10%.

Le U-937 sono cellule ampiamente studiate in letteratura, e sono state oggetto di numerosi studi di differenziazione. Tutti confermano che le cellule di questa linea siano potenzialmente differenziabili a macrofagi. I differenzianti più utilizzati e più efficaci per ottenere tale differenziazione sono l'acido retinoico e il PMA (forbolo 12-miristato 13-acetato). Il PMA somministrato nel terreno di coltura delle U-937 determina un blocco proliferativo delle stesse e induce l'espressione di antigeni monocitari specifici (Leu-M2, Leu-M3, HLADr) e di recettori di superficie (FcR, C3bR) (Minta e Panbrun, 1985). Inoltre è in grado di rendere le cellule capaci di chemiotassi, fagocitosi e reazioni citotossiche anticorpo-mediate (Minta e Panbrun, 1985). Dopo trattamento con PMA, acido retinoico o IFN γ , le U-937 si dimostrano fenotipicamente macrofagi (Grolleau e Sonenberg, 1999) ed esprimono le stesse competenze infiammatorie (compresa la produzione di anione superossido) dei macrofagi maturi (Joyce e Steer, 1992).

La linea cellulare U937 è comunemente utilizzata nei laboratori di ricerca come modello sperimentale di studio dei monociti-macrofagi umani. Questo è validato da diversi studi che confermano la presenza in questa linea dei principali antigeni di superficie espresse nei macrofagi, quando sono opportunamente differenziate.

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del nostro studio è quello di approfondire il ruolo della proteina Gas6 nel controllo della funzione macrofagica. A tale scopo abbiamo adottato un sistema in vitro utilizzando la linea cellulare U937, e ne abbiamo testato la risposta misurando la secrezione di citochine, dopo aver creato le condizioni di un insulto infiammatorio attraverso l'uso dei LPS.

Le basi razionali del lavoro si basano sulle considerazioni che seguono.

I topi knockout per i recettori Tyro3, Mer e Axl sviluppano dopo 4 settimane marcata splenomegalia e linfadenopatia con iperplasia linfoide. Tutte le classi linfocitarie sono coinvolte ma in prevalenza i T CD4+. Inoltre se si inoculano i linfociti del topo triplo mutato in un topo normale singenico non capita nulla, mentre se avviene il contrario i linfociti sani proliferano in modo incontrollato nella milza del topo Knockout. I topi knockout per i recettori inoltre sviluppano quadri di autoimmunità tipo vasculite con sindromi AR, LSE, Sjogren like con ANA, ENA (Anti DS DNA), ab antifosfolipidi, con manifestazioni trombotico/emorragiche cerebrali. Tuttavia i linfociti non esprimono né i tre recettori, né il Gas6. La linea monocito-macrofagica al contrario esprime in modo specifico i tre recettori. I macrofagi dei topi triplo mutati non sono in grado di fagocitare le cellule apoptotiche ma sono iperattivi e producono alti livelli di TNF- α .

Studi su linee cellulari hanno inoltre dimostrato che Mer è essenziale nell'inibizione della secrezione di TNF- α in cellule dendritiche da parte di cellule apoptotiche. Inoltre Axl sembrerebbe essere indotto da IFN- α e la sua attivazione sarebbe parte fondamentale dell'inibizione della secrezione di TNF- α in macrofagi da parte di IFN- α .

L'iperattivazione del sistema linfoide sembrerebbe determinata dalla inappropriata attivazione o dalla mancata inibizione delle cellule monocito-macrofagiche. Quindi il sistema recettoriale del Gas6 (in particolare Mer) sembrerebbe essere essenziale nella regolazione della risposta immunitaria linfocitaria tramite le cellule monocito-macrofagiche, che attraverso questo sistema spegnerebbero la risposta immunitaria specifica cellulo-mediata.

Con il presente studio ci proponiamo di verificare se, e in che misura, la proteina Gas6 sia in grado di modulare l'infiammazione, attraverso un modello in vitro in cui una linea cellulare a differenziazione macrofagica viene stimolata con LPS e trattata con Gas6. L'entità della risposta infiammatoria viene misurata attraverso la produzione di citochine infiammatorie. Inoltre valuteremo quale dei recettori è principalmente responsabile dell'effetto e l'eventuale secrezione di Gas6 conseguente alla stimolazione dei macrofagi. Studieremo poi il segnale attivato a valle del

recettore per Gas6 coinvolto e le modalità con cui esso sarà eventualmente in grado di influire sul segnale attivato da LPS.

I risultati verranno infine verificati su monociti isolati da prelievo di sangue intero.

MATERIALI E METODI

COLTURE CELLULARI

Materiali

- ❖ Linea cellulare U 937 (Linfoma istiocitico umano) (Sundström and Nilsson, 1976) (Banca cellulare ICLC - Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro – Genova).
- ❖ Terreno di coltura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma Aldrich – St. Louis, MO, USA) con l'aggiunta di FBS (Foetal Bovine Serum) al 10%, 2 gr/L di NaHCO₃ (bicarbonato di sodio) e L-Glutamina 2 mM (terreno di coltura standard).
- ❖ Fiasche per colture cellulari da 75 cm² (IWAKI – Giappone).
- ❖ Trypan blue (C₃₄H₂₄N₆O₁₄S₄Na₄. Peso molecolare: 960 g/mol)
- ❖ Camera di Burker (0,0025 mm², profondità 0,100 mm) (FORTUNA[®] - Germania)

Metodo

Le U937 sono seminate in fiasche da 75 cm² (T75) in 10 ml di terreno standard. Le cellule vengono amplificate ogni 3 gg. Ad ogni passaggio vengono seminate 3500000 cellule in 10 ml di terreno in fiasche T75 previa conta in camera di burker e controllo vitalità cellulare con trypan-blue.

DIFFERENZIAZIONE E STIMOLAZIONE

Materiali

- ❖ LPS (lipopolisaccaride) batterico 1 mg/ml concentrazione soluzione madre (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA)
- ❖ PMA (forbolo 12-miristato 13-acetato) 1mg/ml soluzione madre (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA)
- ❖ DMSO, dimetilsolfossido, (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA).
- ❖ Acido trans-retinoico, ATRA, (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA), soluzione madre 5 mM.
- ❖ Piastre per colture cellulari a 12 pozzetti (Well dia. 22mm (IWAKI-Giappone)

- ❖ Terreno di coltura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute(Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) con l'aggiunta di FBS (Foetal Bovine Serum) al 10%, 2 gr/L di NaHCO₃ (bicarbonato di sodio) e L-Glutamina 2 mM.
- ❖ LPS (lipopolisaccaride) batterico, soluzione madre 1mg/ml (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA.)

Metodo

In esperimenti preliminari è stata messa a punto la procedura di differenziazione delle cellule U-937 a monociti/macrofagi. Basandoci sui dati disponibili in letteratura abbiamo deciso di confrontare due sostanze differenzianti, vale a dire ATRA e PMA. Le cellule che hanno ricevuto queste sostanze sono state a loro volta messe a confronto con cellule di controllo (senza differenziante). In breve in diversi esperimenti preliminari $1 \cdot 10^6$ cellule sono state seminate in ogni pozzetto di una piastra da 12 wells in 1 ml di terreno standard. Quindi in diversi esperimenti preliminari e in opportuna sequenza logica ad ogni pozzetto è stato aggiunto PMA alle concentrazioni di 5 e 50 ng/ml, ATRA alla concentrazione finale 1 μ M, DMSO 1%. Dopo 3 o 5 gg è stato aggiunto LPS alla concentrazione finale di 5, 50 e 500 ng/ml (sono stati utilizzati valori di concentrazione crescenti di LPS allo scopo di ottenere la concentrazione ottimale di stimolo e di mettere a punto così il controllo positivo in vista degli esperimenti successivi). Dopo 8 ore dallo stimolo viene valutata la differenziazione alla valutazione visiva al microscopio ottico, viene inoltre raccolto il surnatante, centrifugato per 10 minuti a 14000 rpm a 4°C, quindi congelato a -80°C in attesa di essere utilizzato per il dosaggio del TNF- α (vedi relativo paragrafo).

ESPERIMENTI DI MODULAZIONE DELLA SECREZIONE DI CITOCHINE CON LA PROTEINA Gas6

Materiali

- ❖ rh-Gas6 (recombinant human Growth Arrest Specific protein 6), soluzione madre alla concentrazione di 2,6 mg/ml. (Amgen inc-California. Dono del Dott. B. Varnum)
- ❖ LPS (lipopolisaccaride) batterico, soluzione madre 1mg/ml (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA.)
- ❖ Anticorpo policlonale goat anti-Axl (porzione N-terminale extracellulare) purificato per affinità, soluzione madre 0,2 mg/ml in PBS (R&D Systems, Minneapolis, USA).

- ❖ Anticorpo policlonale goat anti-Mer (porzione extracellulare N-terminale) purificato per affinità, soluzione madre 0,2 mg/ml in PBS-sodio azide (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA).
- ❖ PMA (forbolo 12-miristato 13-acetato) soluzione madre 1mg/ml. (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA.)
- ❖ Piastre per colture cellulari a 24 pozzetti (Well dia. 16mm) (IWAKI-Giappone)
- ❖ Terreno di coltura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma Aldrich – St. Louis, MO, USA) addizionato con 2 gr/L di NaHCO₃ (bicarbonato di sodio) e L-Glutamina 2 mM in presenza (terreno standard) o in assenza di Foetal Bovine Serum (FBS) al 10%.
- ❖ RIPA Buffer: Nonidet P-40 1%, Sodio deossicolato 0,5%, Sodio Dodecilsolfato 0,1%, PBS 1X fino a volume. All'uso aggiungo 10 µl/ml PMSF 10 mg/ml, 1 µl/ml Aprotinina 10 mg/ml, 1 µl/ml Sodio ortovanadato 1 M, 2 µl/ml Sodio fluoruro
- ❖ Nuclear Extract Kit (Active Motif, Rixensart, Belgium)

Metodo

In breve 50000 cellule U-937 per gli esperimenti dedicati al dosaggio del TNF- α e 150000 cellule per gli esperimenti dedicati al dosaggio di altre citochine sono state seminate in ogni pozzetto di una piastra da 24 wells in 500 µl di terreno standard. Quindi ad ogni pozzetto è stato aggiunto PMA alla concentrazione di 5 ng/ml e le piastre sono poste poi in incubatore alla temperatura di 37°C con [CO₂] = 5 % per 4 giorni per ottenere opportuna differenziazione. Quindi, il terreno standard viene sostituito con RPMI 1640 + 2 gr/L di NaHCO₃ e L-Glutamina 2 mM, + PMA 5ng/ml senza siero e le cellule vengono riposte ancora in incubatore per 24 ore. Trascorso tale periodo i pozzetti sono stati stimolati, in duplicato, in esperimenti differenti con varie combinazioni di LPS 5ng/ml, Gas6 200 ng/ml, ab anti-Mer 1, 10 µg/ml, ab anti Axl 1, 10 µg/ml, ad esclusione dei controlli negativi. Quindi le piastre sono nuovamente riposte in incubatore. Il contenuto dei pozzetti viene poi raccolto ad intervalli diversi (3, 6, 12, 24, 48h), centrifugato a 14000 rpm a 4°C per 10 minuti, ed il surnatante viene aliquotato e congelato a -80°C. Le cellule invece verranno trattate con RIPA buffer per ottenere lisati cellulari totali oppure verranno trattate con l'apposito kit al fine di ottenere separatamente le frazioni citoplasmatica e nucleare. Gli esperimenti sopra descritti sono stati ripetuti almeno 5 volte (eseguiti in quintuplicato) e ciascuna condizione sperimentale è stata eseguita almeno in duplicato. Alcuni esperimenti sono stati eseguiti anche in terreno standard in presenza di FBS 10%.

ISOLAMENTO E COLTURA DI MONOCITI

Materiali

- ❖ Prelievo di sangue intero (circa 50 ml) raccolto in citrato
- ❖ Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)
- ❖ Soluzione fisiologica: Sodio Cloruro 0,9% per infusione endovenosa (Baxter, Roma, Italy)
- ❖ StemSep Cell Separation: kit per l'isolamento di monociti per selezione negativa (StemCell Technologies, Grenoble, France)

Metodo

Si effettua un prelievo sterile e si diluisce il sangue in soluzione fisiologica in rapporto 1:2. Si preparano le provette con il ficoll calcolando che il rapporto finale con il sangue deve essere 3:10. Il sangue va colato delicatamente sopra il ficoll, facendolo scorrere lungo la parete della provetta.

Si centrifuga a temperatura ambiente a 2000 rpm per 30 minuti eliminando la decelerazione. Ottenuta in questo modo la stratificazione contro gradiente si elimina il surnatante che contiene plasma e piastrine (colore giallo limpido) e si raccoglie l'anello opaco che si pone all'interfaccia tra il surnatante giallo e il liquido inferiore, lasciando sul fondo un pellet rosso composto da globuli rossi e granulociti.

Il liquido bianco viene ulteriormente diluito con soluzione fisiologica e centrifugato per 10 minuti a 1300 rpm.

Il pellet ottenuto viene poi trattato secondo il protocollo fornito con il kit che prevede l'isolamento dei monociti per selezione negativa. Questo significa che il pellet verrà trattato con un cocktail di anticorpi coniugati con sferette magnetiche. Tramite il passaggio attraverso una colonna magnetica, tutte le cellule riconosciute dai suddetti anticorpi verranno trattenute, mentre i monociti passeranno liberamente e potranno essere ritrovati nelle frazioni raccolte dalla colonna. In questo modo la popolazione ottenuta non risulta attivata dalla stessa procedura di isolamento.

I monociti così isolati vengono piastrati per 7 giorni in terreno contenente siero, poi per 24 ore in terreno senza siero e quindi stimolati con LPS 5 ng/ml e Gas6 200 ng/ml per 3, 6, 24 e 48 ore. I surnatanti verranno quindi raccolti, centrifugati a 14000 rpm a 4°C per 10 minuti, ed il surnatante viene aliquotato e congelato a -80°C.

DOSAGGIO DI GAS6

Materiali

Sistema E.L.I.S.A sandwich per dosaggio di Gas6 messo a punto e valicato presso il nostro laboratorio (Alciato et al., 2007. In press):

- ❖ Piastre per test E.L.I.S.A (Nunc maxi sorp, Nunc, USA) da 96 pozzetti
- ❖ Anticorpo primario policlonale purificato per affinità goat anti-Gas6 (R&D Systems, Minneapolis, USA), soluzione madre 0,1 mg/ml.
- ❖ Anticorpo biotinilato purificato per affinità goat anti-Gas6 (R&D Systems, Minneapolis, USA), soluzione madre 50 ng/ml.
- ❖ rh-Gas6 standard soluzione madre 250 µg/ml in PBS-BSA 0.1%. (Amgen, CA, USA, dono dott. B. Varnum)
- ❖ Albumina bovina (BSA) in polvere, (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA).
- ❖ Complesso Streptavidina-HRP (Menarini Diagnostic, Firenze)
- ❖ TMB soluzione (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA).
- ❖ PBS [20 x] (Phosphate Buffer Saline) (32 gr di Na₂HPO₄·2H₂O + 6 gr di NaH₂PO₄·2H₂O + 164 gr di NaCl in 900 ml di acqua distillata, pH aggiustato a 6,8-6,9 con HCl o NaOH, quindi portato ad 1 litro con acqua distillata ottenendo un pH tra 7,2 e 7,4)
- ❖ Soluzione di bloccaggio/incubazione: Albumina bovina sierica (BSA) 2.5% in PBS-Tween.
- ❖ Soluzione di lavaggio PBS TWEEN 20 (PBS [1 x] + 0,05% di TWEEN 20)
- ❖ Acido solforico 1,8 M (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA.)

Metodo

In esperimenti preliminari abbiamo stabilito le concentrazioni degli anticorpi per avere un buon rapporto tra sensibilità, specificità e background (anticorpo primario 350 ng/ml in PBS; anticorpo biotinilato 15 ng/ml). Al fine di ridurre il più possibile il background abbiamo determinato inoltre la diluizione migliore e la matrice più adatta in cui diluire i campioni. In breve l'anticorpo primario viene incubato overnight a temperatura ambiente alla concentrazione di 350 ng/ml in PBS. I pozzetti vengono saturati con soluzione di bloccaggio per 2 ore. I campioni e la curva standard, preparata con le seguenti concentrazioni: 2 – 1,33 – 0,88 – 0,60 – 0,40 – 0,26 – 0,18 – 0 ng/ml (fattore di diluizione fisso 1,5), vengono caricati sulla piastra e incubati per 2 ore a temperatura ambiente su agitatore a 300 rpm. Viene quindi aggiunto l'anticorpo biotinilato diluito in soluzione di incubazione. Il complesso streptavidina-perossidasi viene diluito fino a 400 ng/ml in soluzione di

incubazione e lasciato in piastra a temperatura ambiente per 15 minuti. Infine viene aggiunto TMB per ogni pozzetto per 30 minuti a temperatura ambiente. La reazione immuno-enzimatica viene bloccata tramite acido solforico 1.8 M e le concentrazioni vengono determinate per confronto con gli standard (interpolazione tramite regressione logistica a 4 parametri) dopo lettura delle assorbanze a 450 nm, con lettura di riferimento a 570 nm. Tutte le incubazioni avvengono in un volume di 50 µl per pozzetto fuorché per la reazione di bloccaggio in albumina (200 µl per pozzetto). Inoltre dopo ogni incubazione i pozzetti vengono svuotati, lavati per 5 volte con soluzione di lavaggio e asciugati per aspirazione.

DOSAGGIO DELLE CITOCHINE

Materiali

- ❖ Kit E.L.I.S.A per dosaggio di IL-6 e TNF- α (Saquin® Amsterdam-Olanda) contenente:
 - Piastre per test E.L.I.S.A (Nunc maxi sorp, Nunc, USA) da 96 pozzetti
 - Anticorpo primario anti-TNF- α (Saquin® Amsterdam-Olanda)
 - Anticorpo biotilato anti TNF- α (Saquin® Amsterdam-Olanda)
 - Anticorpo primario anti-IL-6 (Saquin® Amsterdam-Olanda)
 - Anticorpo biotinilato anti-IL-6 (Saquin® Amsterdam-Olanda)
 - TNF- α standard liofilizzato (2900 pg/ml) (Saquin® Amsterdam-Olanda)
 - IL-6 standard (4500 pg/ml) (Saquin® Amsterdam-Olanda)
 - Bloccante (Saquin® Amsterdam-Olanda)
 - Streptavidina poli-HRP coniugata (Saquin® Amsterdam-Olanda)
 - Buffer di diluizione (Saquin® Amsterdam-Olanda)
 - TMB in DMSO (30 mg di 3,5,3',5'-tetrametilbenzidina (TMB) in 5 ml di dimetilsolfossido (DMSO))
- ❖ Buffer substrato per TMB (15 gr di sodio-acetato triidrato ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) in 800 ml di acqua distillata con pH aggiustato a 5,5 con acido acetico, quindi portato ad 1 litro con acqua distillata)
- ❖ Perossido di idrogeno (H_2O_2) al 3%
- ❖ PBS [20 x] (Phosphate Buffer Saline) (32 gr di $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 6 gr di $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 164 gr di NaCl in 900 ml di acqua distillata, pH aggiustato a 6,8-6,9 con HCl o NaOH, quindi portato ad 1 litro con acqua distillata ottenendo un pH tra 7,2 e 7,4)
- ❖ PBS TWEEN 20 (PBS [1 x] + 0,005% di TWEEN 20)
- ❖ Acido solforico 1,8 M (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA.)

❖ Kit Bio-Plex Human Cytokine Panel (BioRad, USA)

Metodo

Il dosaggio delle citochine (TNF- α e IL-6) è stato eseguito mediante metodo E.L.I.S.A (enzyme-linked immunosorbent assay) sandwich. La procedura è stata eseguita seguendo le istruzioni del produttore. Il metodo prevede il legame di un anticorpo primario, il quale si lega al polistirene della piastra dopo incubazione overnight. Attraverso il lavaggio dei pozzetti con PBS-TWEEN, si rimuove l'anticorpo primario in eccesso. Prima di caricare gli standard e i campioni da analizzare è necessario caricare tutti i pozzetti con un bloccante (mix di proteine) le cui proteine vanno ad occupare i siti di legame liberi del polistirene, in modo da saturare la piastra. Così la citochina da dosare può resistere al lavaggio solo se riconosciuta dal proprio anticorpo primario, e non ha possibilità di legare il polistirene. Il terzo step prevede la preparazione dei campioni e della curva standard. I campioni si preparano per diluizione, la quale avrà un rapporto campione/buffer di diluizione in funzione dell'intensità di colorazione attesa; la nostra esperienza ci ha portato a diluire i campioni destinati all'analisi del TNF- α a 1:5 o 1:10, mentre se si dosa IL-6 sono diluiti a 1:2. La curva standard viene costruita attraverso diluizioni successive con un fattore di diluizione fisso in modo da ottenere otto valori noti. Quindi si caricano i pozzetti con la curva standard (sempre in duplicato) e con i campioni (in duplicato o in triplicato) e si mantiene in incubazione a temperatura ambiente per un ora. Scaduto tale termine si lava nuovamente con PBS TWEEN e si caricano tutti i pozzetti con l'anticorpo biotinilato. Questo riconosce la citochina da dosare e resiste al lavaggio solo se questa è presente, cioè solo se è stata trattenuta dal legame con l'anticorpo primario. Si lascia incubare per un ora a temperatura ambiente e si lava con PBS TWEEN. Quindi si caricano tutti i pozzetti con streptavidina coniugata a HRP (horseradish peroxidase-perossidasi di rafano) la quale lega la biotina coniugata all'anticorpo biotinilato, si lascia incubare per 30 minuti a temperatura ambiente e si lava con PBS TWEEN. A questo punto si caricano tutti i pozzetti con TMB che in presenza di perossidasi coniugata alla streptavidina viene ossidato dando alla piastra un colore blu-azzurro. Terminato lo sviluppo si caricano tutti i pozzetti con acido solforico 1,8 M senza lavare. Tale operazione determina il viraggio di colorazione dal blu al giallo e blocca la reazione. La piastra è pronta per la lettura attraverso lo spettrofotometro (lunghezze d'onda a 450 e 570 nm). Il metodo del calcolo delle concentrazioni della citochina analizzata è di tipo comparativo, l'intensità della colorazione dei pozzetti viene confrontata con quelli degli standard, di cui i valori sono noti. La costruzione matematica della curva viene effettuata attraverso il metodo di regressione 4PL (4 parameters logistic regression).

Le restanti citochine (IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-13) sono state dosate tramite un metodo standardizzato che permette di verificare la concentrazione di pi \dot{u} antigeni contemporaneamente. Il metodo prevede l'utilizzo di microsfele di polistirene coniugate con l'anticorpo primario. Il campione viene trattato con mix di microsfele coniugate con Ab diversi e ciascun anticorpo lega il proprio antigene specifico. Vengono poi aggiunti anticorpi secondari fluorescinati ciascuno specifico per un dato antigene. Una sorgente laser a 635 nm (rosso) determina l'emissione di fluorescenza delle sfere (diversa per ogni set) mentre una sorgente laser a 532 nm (verde) determina l'emissione di fluorescenza della ficoeritrina coniugata agli anticorpi. Infine si effettuerà il calcolo della concentrazione di ciascuna citochina tramite l'utilizzo di un apposito algoritmo computerizzato.

DOSAGGIO DI PHOSPHO-Axl

Materiali

- ❖ Piastre per test E.L.I.S.A (Nunc maxi sorp, Nunc, USA) da 96 pozzetti
- ❖ Kit E.L.I.S.A per dosaggio di Human Phospho-Axl (R&D Systems, Minneapolis, USA) contenente:
 - Phospho-Axl Capture Antibody
 - Anti-Phospho-Tyrosine-HRP Detection Antibody
 - Phospho-Axl Control
- ❖ PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2 - 7.4.
- ❖ Wash Buffer: 0.05% Tween_20 in PBS, pH 7.2 - 7.4
- ❖ Block Buffer: 1% BSA*, 0.05% NaN₃ in PBS, pH 7.2 - 7.4.
- ❖ IC Diluent 12: 1% NP-40, 20 mM Tris (pH 8.0), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodio orthovanadato.
- ❖ IC Diluent 14: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 0.1% BSA, pH 7.2 - 7.4.
- ❖ Substrate Solution: mix 1:1 di Color Reagent A (H₂O₂) e Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)
- ❖ Stop Solution: 2 N H₂SO₄

Metodo

Si parte diluendo il *Capture Antibody* fino ad una concentrazione di 8.0 μ g/ml in PBS ed aliquotandone 100 μ l per ogni pozzetto di una piastra da 96 pozzetti. Dopo incubazione

overnight a temperatura ambiente la piastra viene lavata 5 volte e bloccata con Block Buffer per 2 ore a temperatura ambiente.

Dopo un ulteriore lavaggio, i campioni opportunamente diluiti e gli standard vengono aliquotati in piastra ed incubati per 2 ore a temperatura ambiente. Appena prima dell'uso viene preparato il *Detection Antibody*, che viene lasciato in piastra per 2 ore a temperatura ambiente evitando l'esposizione diretta alla luce. Infine si aggiungono 100 µl per pozzetto di *Substrate Solution* e dopo 20 minuti si blocca la reazione immunoenzimatica con acido solforico. Il colore blu che si era sviluppato nelle piastre virerà a giallo e la lettura delle assorbanze a 450 nm e 570 nm, seguita da interpolazione con gli standard tramite metodo di regressione 4PL (four parameters logistic regression), permetterà di risalire alla concentrazione di proteina fosforilata.

IMMUNOBLOT (WESTERN BLOT) PER p-MER

Materiali

- ❖ TBS (tris buffered saline) soluzione madre 10x: Tris 1M pH 7.5, 9% NaCl
- ❖ Beta-mercaptoetanol (Fluka, Germania).
- ❖ Anticorpo policlonale rabbit anti fosfo-Mer (p-MER) purificato per affinità, soluzione madre 0,67 mg/ml in PBS (Abcam, UK).
- ❖ Anticorpi policlonali rabbit anti Akt e anti fosfo-Akt purificati per affinità (Cell Signaling Technology, Boston, USA)
- ❖ Anticorpi policlonali rabbit anti GSK-3β, fosfo- GSK-3β, NFκB e goat anti Mer purificati per affinità, soluzioni madre 0,2 mg/ml (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- ❖ Anticorpo secondario policlonale chicken anti-rabbit IgG-HRP, soluzione madre 0,4 mg/ml (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- ❖ Anticorpo secondario policlonale rabbit anti-goat IgG-HRP, soluzione madre 0,4 mg/ml (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- ❖ Stacking gel: 1 ml stacking buffer pH 6,8 (0,5M TrisCl + SDS 0,4%), 0,670 ml acrilammide 30%, porto a 4 ml con acqua deionizzata, 40 µl APS (ammonio persolfato) e 4 µl TEMED
- ❖ Separating gel: 3 ml acrilammide 30%, 2,5 ml separating buffer pH 8,8 (1.5M TrisCl + 0,4% SDS), porto a 10 ml con acqua demonizzata, 100 µl di APS e 10 µl di TEMED
- ❖ Laemli buffer: 15,1 g Tris base, 72 g Glicina, 5 g SDS. Porto a 1 litro con dH₂O
- ❖ Loading buffer: 25ml 4x TrisCl/SDS pH 6.8 (Stacking Buffer), 20 ml glicerolo, 4g SDS, 1 mg Bromofenolblu. Porto a 100 ml con acqua demonizzata e aggiungo 5% β-mercaptoetanol.

- ❖ Transfer buffer: 9,1 g Tris, 43,25 g Glicina. Dissolvo in 2 litri di acqua demonizzata. Aggiungo 600 ml metanolo. Aggiusto il pH a 8.3/8.4. Porto a 3 litri con dH₂O
- ❖ Soluzione bloccante e/o di incubazione (Albumina 5% in TBS-Tween).
- ❖ Soluzione di lavaggio: TBS 1X, Tween 20 0.05%
- ❖ Membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad, USA).
- ❖ Rosso ponceau soluzione.
- ❖ Soluzione di sviluppo per chemiluminescenza (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA.).
- ❖ Camera di corsa e trasferimento (Bio-Rad, USA).
- ❖ Lettore chemiluminescenza (Bio-Rad, USA).

Metodo

Ogni campione viene diluito 1:2 in loading buffer quindi portato a 96°C per 5'. Quindi i campioni vengono caricati sul gel di poliacrilamide opportunamente preparato. Si esegue corsa elettroforetica con il sistema SDS-PAGE in Laemli buffer per 2 h a 50-70 mA. Quindi il gel viene opportunamente posizionato aderente alla membrana di nitrocellulosa e viene assemblato un sistema di trasferimento in Transfer buffer. Il trasferimento viene eseguito in un apposito apparato overnight a 4°C (14V). La nitrocellulosa viene colorata con rosso ponceau per valutare l'avvenuto trasferimento quindi bloccata con BSA 5% in TBS tween per 2 ore su agitatore. Quindi si esegue incubazione con anticorpo primario in soluzione di incubazione (BSA 5% in TBS Tween) per 1 ora in agitatore. Si eseguono 3 lavaggi con TBS-Tween e si incuba la membrana con anticorpo secondario in BSA 5% in TBS-Tween per 45 minuti in agitazione. Si eseguono nuovamente 3 lavaggi con soluzione di lavaggio e si lascia la membrana in TBS. A questo punto la membrana viene incubata in soluzione di sviluppo ed esposta nel sistema di lettura per chemiluminescenza per tempi variabili in base al segnale rilevato.

EMSA (electrophoretic mobility shift assay)

Materiali

- ❖ Buffer di corsa: Tris-borate-EDTA (TBE) soluzione madre 10X, soluzione di lavoro 0,5X
- ❖ Gel di acrilammide al 5%: 4,1 ml acrilammide (40:1 acrylamide:bis); 19,25 ml acqua demonizzata; 1,25 ml TBE 10X; 0,075 ml TEMED; 0,1 ml APS 25%
- ❖ Poly(dI-dC): sequenze casuali per saturare i siti di legame (Promega Italia srl, Milano, Italy)

- ❖ Binding buffer: 20% glycerol, 5mM MgCl₂, 2.5mM EDTA, 2.5mM DTT, 250mM NaCl, 50mM Tris 7.5, 0.25mg/ml poly(dI-dC)
- ❖ Sonda: utilizzata tal quale o marcata con fosforo radioattivo tramite la chinasi poly T4 (Primm, Milano, Italy; Promega Italia srl, Milano, Italy)
- ❖ Soluzione di stabilizzazione: etanolo 20%, acido acetico 10%
- ❖ Camera di corsa (Bio-Rad, USA).
- ❖ Essiccatore
- ❖ Lastre

Metodo

Dopo aver preparato e colato il gel nell'apposita apparecchiatura, lo si lascia polimerizzare overnight a 4°C. Il giorno seguente si esegue una precorsa per 30 minuti a 150V caricando soltanto TBE 0,5X. In seguito vengono preparati tutti i campioni con la sonda marcata oltre ad uno pretrattato con la sonda non marcata, che utilizzerò come controllo. I campioni caricati sul gel vengono lasciati correre per 2 ore a 4°C a 200V, dopodichè il gel viene fatto essiccare sopra ad uno strato di carta bibula, coperto da pellicola trasparente per 45 minuti. In seguito la carta, a cui sarà rimasto attaccato il gel essiccato, viene messa in una scatola portalastra al di sotto di una lastra che rimarrà impressionata in corrispondenza del fondo del gel, dove sarà la sonda non legata, ed in ogni punto ove la sonda ha interagito con la proteina di interesse, in questo caso il fattore di trascrizione NFκB.

RISULTATI

Gas6 influenza la produzione di citochine nella linea cellulare U937

Dopo aver verificato che la linea cellulare U937, da noi utilizzata in questo studio come modello monocito-macrofagico, non secerne la proteina Gas6 né prima né dopo il differenziamento da noi indotto, siamo partiti con esperimenti preliminari volti a verificare le condizioni sperimentali ottimali. In primo luogo abbiamo determinato il tipo di differenziante, la sua concentrazione e la concentrazione di LPS. Dai risultati di esperimenti preliminari emerge che il PMA è in grado di differenziare più efficacemente le U937 rispetto all'acido retinoico in termini di secrezione di TNF- α , e che questo effetto non dipende dalla concentrazione dell'LPS (Tabella 2).

Tipo di differenziante	LPS [ng/ml]			
	10	50	100	500
Nessun differenziante	0	0	0	0
Ac. Retinoico 1 μ M	36	39	54	74
PMA 5 ng/ml	386	344	368	364

Tabella 2. Valori di concentrazione di TNF- α misurati su surnatante di U-937 a 6 ore espressi in pg/ml.

In ulteriori esperimenti abbiamo osservato risultati analoghi anche con concentrazioni di LPS inferiori (5 ng/ml). Questa è la concentrazione poi adottata in tutti gli esperimenti. Abbiamo infine scelto la concentrazione di PMA più efficace: la trasformazione è evidente per le cellule trattate con PMA e la differenza rispetto al controllo è netta; non ci sono invece sostanziali differenze tra quelle trattate con PMA a 5 e 50 ng/ml, pertanto per limitarne la tossicità abbiamo scelto la concentrazione di 5 ng/ml. Infine abbiamo determinato la concentrazione di massima efficacia della proteina Gas6 che è risultata 200 ng/ml. Le cellule, dopo 24 ore di incubazione in terreno senza siero, vengono stimulate seguendo le condizioni sopra descritte e i surnatanti vengono raccolti dopo 3, 6, 12, 24 e, dove necessario, anche 48 ore. Il dosaggio delle citochine ci ha rivelato che, se non vi sono variazioni statisticamente significative per IL-12 ed IL-13, lo stesso non si può dire per TNF- α , IL-6, IL-1 β ed IL-10.

Gas6 riduce la concentrazione di TNF- α nel surnatante delle cellule U-937 del 47%, raggiungendo l'effetto maggiore a 6 e 12 ore, mentre a 24 ore l'effetto viene mantenuto solo parzialmente. Per quanto riguarda la secrezione di IL-6, Gas6 esercita un effetto inibitorio che a 6 ore inizia a evidenziarsi, è massimo a 24 ore (riduzione del 60%) e viene a ridursi a 48 ore. Anche la

produzione di IL-1 β viene inibita dal trattamento delle cellule con Gas6, però la cinetica di rilascio di questa citochina è risultata più lenta quindi l'effetto massimo, che noi vediamo a 48 ore con una riduzione del 35%, potrebbe essere ancora più evidente a tempi più lunghi. L'unica che viene indotta dal trattamento con Gas6 è la citochina anti-infiammatoria IL-10, per la quale l'effetto massimo è riscontrabile a 24 ore con un picco di concentrazione del 46%. (Figure 2 e 3)

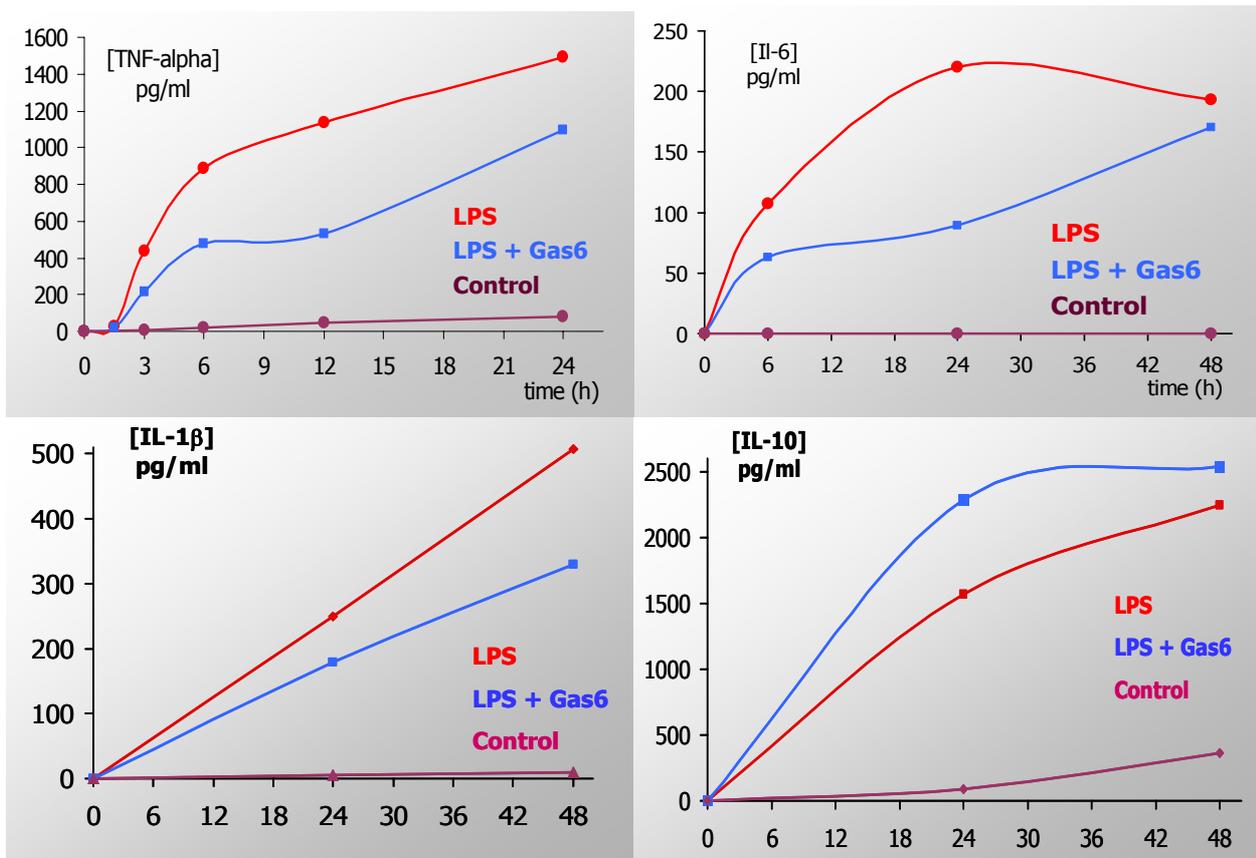


Figura 2. Cinetica di produzione delle citochine TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 dopo stimolazione con LPS 5 ng/ml (curve rosse) ed effetto del trattamento con Gas6 200 ng/ml (curve blu).

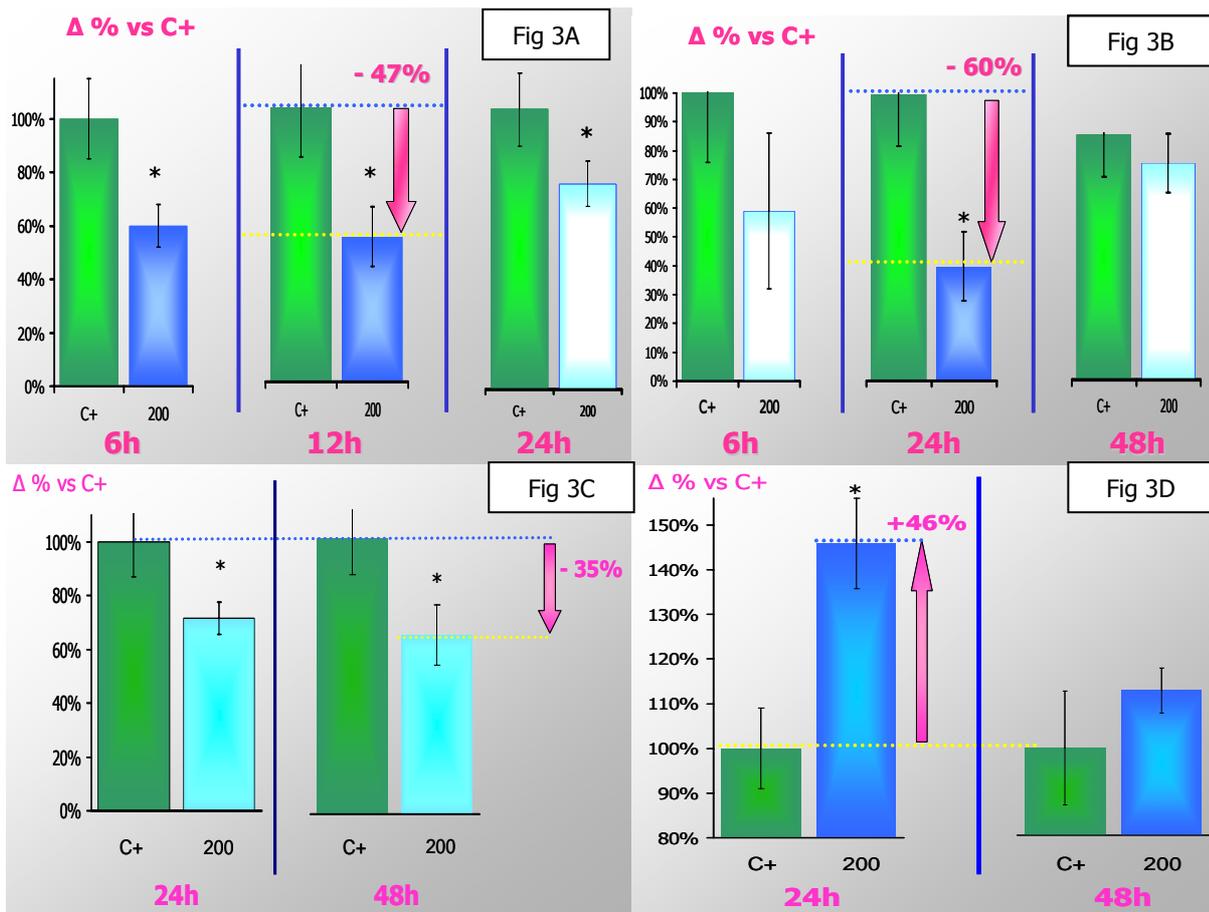


Figura 3. Variazione percentuale indotta dal trattamento con Gas6 200 ng/ml su TNF- α (Fig 3A), IL-6 (Fig 3B), IL-1 β (Fig 3C), IL-10 (Fig 3D).

Conferma dei risultati su monociti isolati da sangue intero

I risultati esposti hanno trovato conferma su monociti isolati da sangue intero. In particolare è stata misurata la concentrazione di TNF- α a 3, 6 e 24 ore dopo lo stimolo con LPS 5 ng/ml e Gas6 200 ng/ml. Risulta evidente come la cellula isolata non riesca a sopravvivere in terreno senza siero per più di poche ore quindi è risultato possibile effettuare una valutazione attendibile soltanto sui surnatanti prelevati dopo 3 ore. In questo caso la concentrazione di TNF- α risulta ridotta del 52%. (Figura 4).

Ogni risultato riportato viene ottenuto dalla media di almeno 3 esperimenti.

TNF- α in monociti isolati

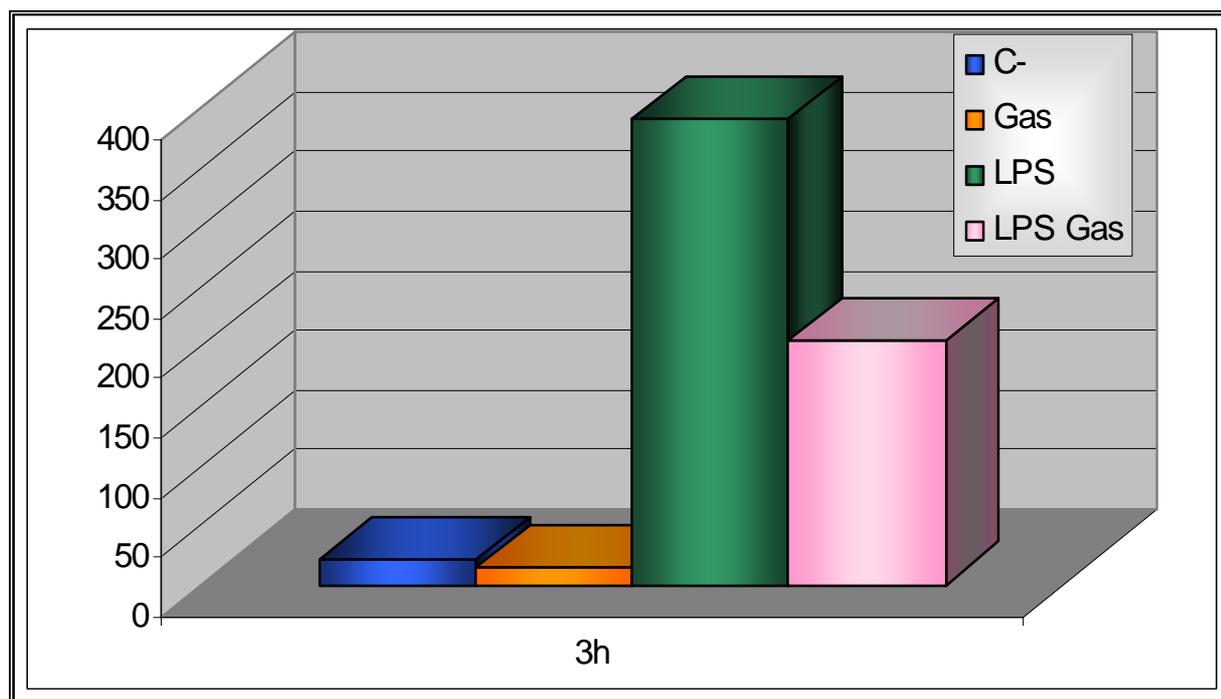


Figura 4. Riduzione della concentrazione di TNF- α indotta dal trattamento di monociti isolati con LPS 5ng/ml più Gas6 200 ng/ml rispetto al trattamento con solo LPS.

L'effetto di Gas6 è mediato dal recettore Mer

In considerazione del fatto che Gas6 è ligando di tre recettori tirosina chinasi e che almeno due di essi sono espressi dai monociti (Axl e Mer) (Neubauer et al., 1994; Neubauer et al., 1997; Lu e Lemke 2001), abbiamo valutato tramite quale recettore Gas6 fosse grado di ridurre la secrezione di IL-6 dopo stimolo con LPS (5 ng/ml).

Nella figura 5 è riportata la variazione percentuale della concentrazione di IL-6 a 24 ore rispetto al controllo positivo (100%). Risulta evidente che l'effetto esercitato da Gas6 sull'inibizione della secrezione di IL-6 si mantiene invariato in presenza dell'anticorpo anti-Axl mentre viene completamente abolito in presenza di anticorpo anti-Mer alle concentrazioni di 1 e 10 μ g/ml. Parallelamente abbiamo verificato che gli anticorpi anti-Mer e anti-Axl non determinassero attivazione aspecifica delle cellule U-937 e conseguente variazione di secrezione di IL-6 rispetto al controllo negativo. Ogni risultato riportato viene ottenuto dalla media di almeno 3 esperimenti.

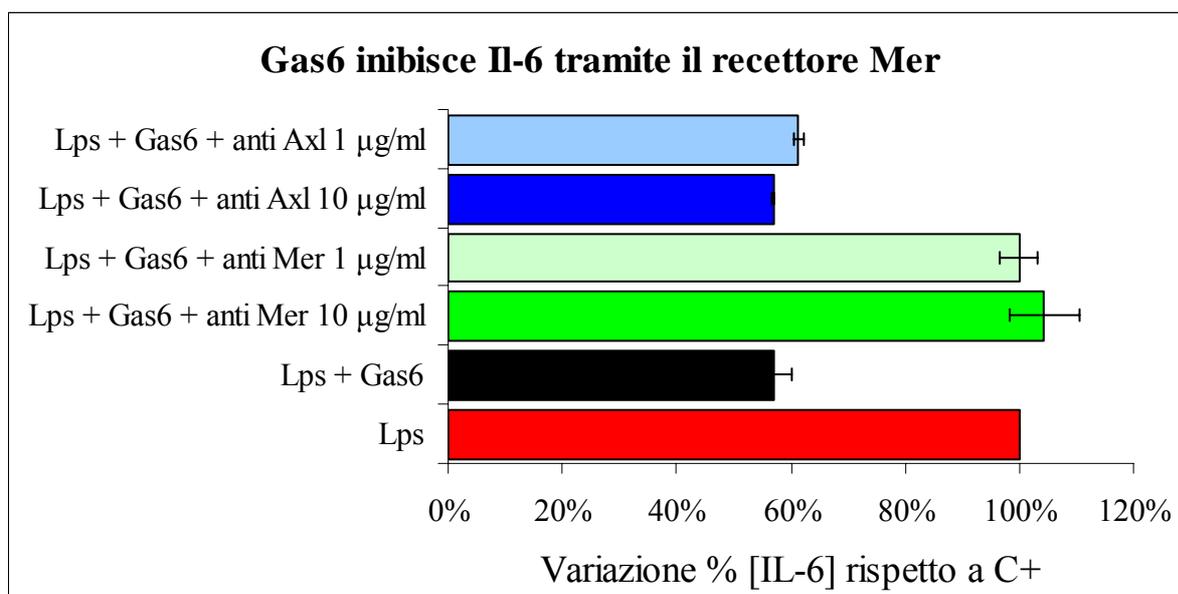


Figura 5. La figura riporta le variazioni percentuali (ascissa) della secrezione di IL-6 rispetto al controllo positivo di ciascuno dei 3 esperimenti eseguiti. Dall'alto LPS + Gas6 in presenza di anticorpo anti-Axl 1 µg/ml e 10 µg/ml, di anticorpo anti-Mer 1 e 10 µg/ml. LPS viene impiegato alla concentrazione di 5ng/ml, Gas6 alla concentrazione di 200 ng/ml.

Il risultato è stato verificato analizzando lisati cellulari tramite immunoblotting alla ricerca del recettore Mer fosforilato, cioè nella sua forma attivata. Parallelamente abbiamo analizzato gli stessi lisati tramite un metodo E.L.I.S.A. appositamente creato per rilevare la presenza del recettore Axl nella sua forma attiva fosforilata. Mentre non è stato possibile evidenziare la presenza di fosfo-Axl nei nostri lisati, Mer risulta essere presente e fosforilato. La cinetica di fosforilazione prevede un'attivazione basale a 5 minuti dallo stimolo con Gas6 200 ng/ml, paragonabile a quella del controllo negativo non trattato, una fosforilazione più evidente a 15 minuti dal trattamento per poi arrivare ad un picco di attivazione a 30 minuti, che persiste anche a 60 minuti dopo il trattamento (Figura 6).

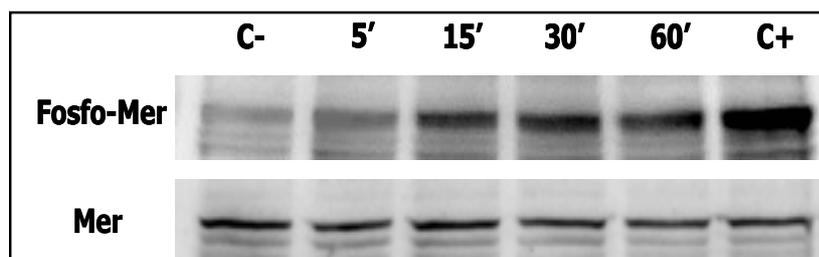


Figura 6. Cinetica di attivazione del recettore Mer in cellule U937 trattate con Gas6 200 ng/ml, lisate ed analizzate tramite immunoblotting

Come ulteriore verifica di questo dato abbiamo effettuato esperimenti di immunoblotting con anticorpo anti-Akt, proteina inclusa nel segnale attivato da Gas6/Mer (Guttridge et al.,2002), su lisati cellulari trattati con gli stessi anticorpi inibitori dei recettori Axl e Mer usati in precedenza. E' possibile notare come il trattamento con il solo Gas6 provochi un incremento nei livelli di fosforilazione di Akt. La banda ottenuta per il solo Gas6 è paragonabile con quelle ottenute con anticorpo anti-Axl sia in presenza che in assenza di Gas6 mentre trattando con anticorpo anti-Mer l'intensità delle bande risulta paragonabile ai livelli del controllo negativo. Per verificare che il sistema fosse affidabile abbiamo utilizzato anche un inibitore di Akt, la wortmannina, che infatti abbatte completamente il segnale. (Figura 7).

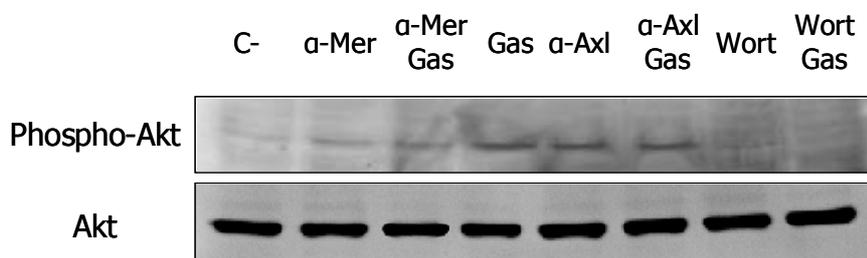


Figura 7. Livelli di induzione della proteina Akt in presenza di anticorpi che vanno ad inibire in maniera specifica i recettori Axl e Mer e confronto con wortmannina, inibitore di Akt. L'anticorpo anti-Mer provoca un calo di fosforilazione della proteina Akt.

Studio del segnale

Sulla base dei risultati ottenuti in precedenza, che mettono in luce una variazione di concentrazione sia di citochine pro- che anti-infiammatorie nel surnatante di cellule U937 dopo trattamento con Gas6, abbiamo ritenuto opportuno verificare su estratti citoplasmatici quale sia il meccanismo molecolare alla base dell'effetto evidenziato. Abbiamo analizzato i livelli di fosforilazione di alcune proteine chiave della cascata del segnale dei TLR, in grado di controllare la produzione di TNF- α ed IL-6, come di IL-10. In primo luogo abbiamo analizzato la cinetica di fosforilazione della proteina Akt (Pengal et al., 2006) la quale sembra risentire dell'effetto del trattamento con Gas6 a tempi molto brevi, con un picco di fosforilazione a 5-15 minuti, nonostante il segnale non sia particolarmente intenso (Figura 8).

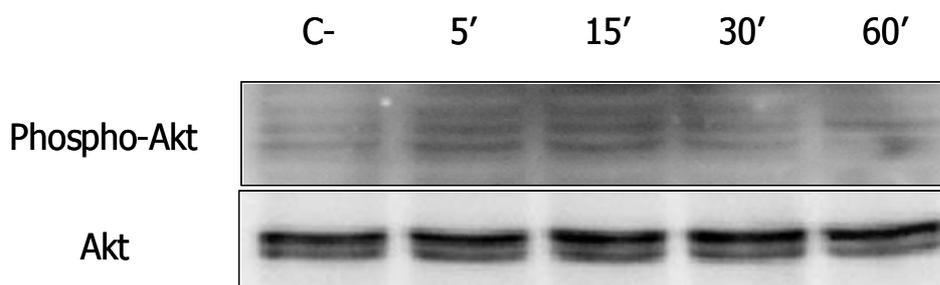


Figura 8. Cinetica di fosforilazione della proteina Akt (pannello in alto) e relativo controllo Akt non fosforilato (pannello in basso)

In secondo luogo abbiamo voluto verificare lo stato di fosforilazione della proteina GSK3 β , ritenuta una componente fondamentale per lo switch della produzione citochinica da pro- ad anti-infiammatoria (Martin et al., 2005). In questo caso bisogna tenere presente che la proteina risulta attiva se non fosforilata, mentre, se fosforilata da chinasi a monte, viene inattivata. In presenza di solo Gas6 vediamo una cinetica di fosforilazione con un picco tra i 15 e i 30 minuti mentre confrontando casi non trattati, trattati con solo LPS, con solo Gas6 e con LPS e Gas6 contemporaneamente, notiamo come la nostra proteina, anche in presenza di LPS, sia in grado di aumentare il livello di fosforilazione di GSK, soprattutto a 30 minuti (Figure 9 e 10).

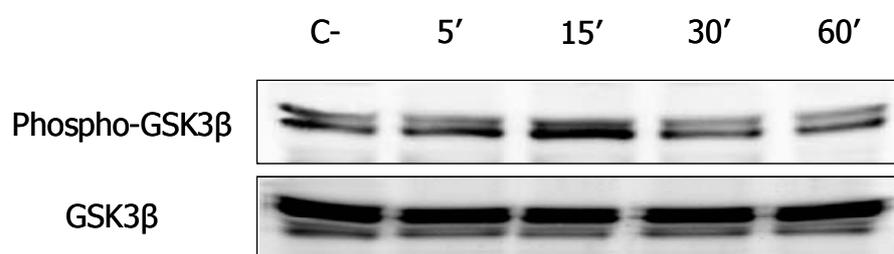


Figura 9. Cinetica di fosforilazione della proteina GSK3 β (pannello in alto) e relativo controllo GSK3 β non fosforilato (pannello in basso)

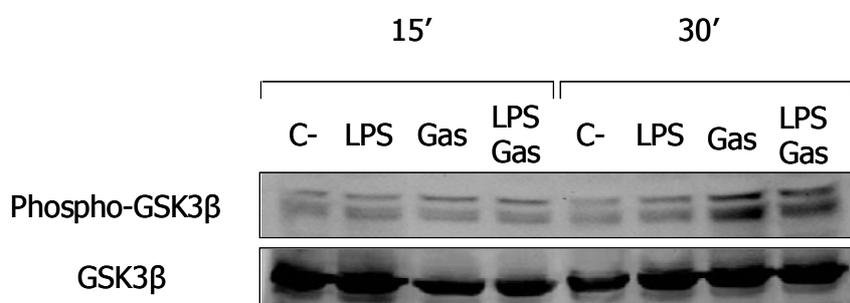


Figura 10. Confronto dei livelli di fosforilazione della proteina GSK3 β in presenza ed assenza di LPS 5 ng/ml e Gas6 200 ng/ml (pannello in alto) e relativo controllo GSK3 β non fosforilato (pannello in basso)

Infine abbiamo testato lo stato di fosforilazione e la funzionalità del fattore di trascrizione NF κ B, che si trova a valle della cascata del segnale, tramite esperimenti di immunoblotting e parallelamente tramite EMSA. L'analisi è stata fatta in entrambi i casi su estratti nucleari e i due metodi confermano il risultato ottenuto: la stimolazione con LPS fosforila, attivandolo, il fattore di trascrizione che può traslocare nel nucleo e legare il DNA adempiendo alla propria funzione; l'aggiunta di Gas6 provoca un evidente calo di NF κ B fosforilato nel nucleo, compatibilmente con una riduzione della produzione di TNF- α ed IL-6 (Hu et al., 2007) (Figura 11).

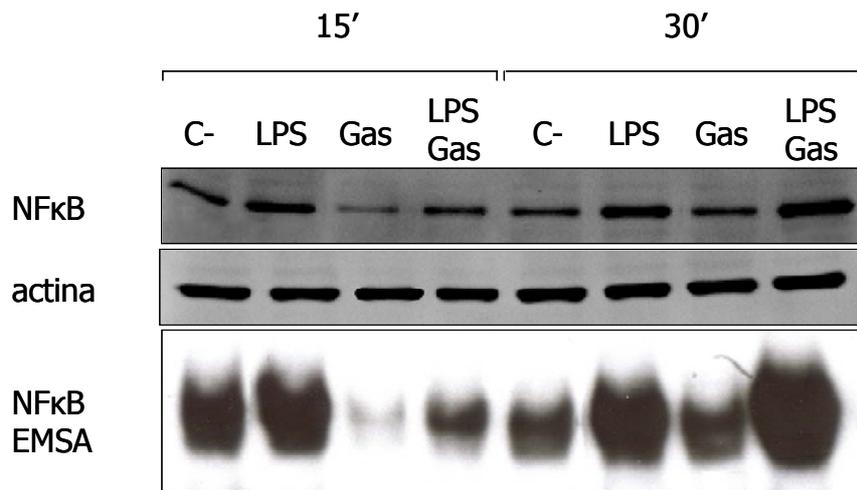


Figura 11. Livelli di fosforilazione del fattore di trascrizione NFκB in lisati nucleari analizzati tramite immunoblotting (pannello in alto) e electrophoretic mobility shift assay (EMSA) (pannello in basso)

DISCUSSIONE

La proteina Gas6 è riconosciuta da tre recettori tirosina chinasi Axl (Varnum et al., 1995 e Stitt et al., 1995), Tyro 3 (Godowski et al., 1995 e Chen et al., 1997) e Mer (Graham et al., 1994; Chen et al., 1997). Le funzioni di tale proteina non sono del tutto definite, tuttavia pare essere coinvolta in diversi processi, quali il controllo dell'apoptosi (Bellosta et al., 1997), la regolazione dell'emostasi (Angelillo-Sherrer et al., 2001; Angelillo-Sherrer et al., 2005) e dell'angiogenesi (Gallicchio et al., 2005). Recentemente sono emerse alcune evidenze sperimentali riguardo ad un potenziale ruolo di tale proteina nel processo infiammatorio. Tale ipotesi deriva dal riscontro dell'espressione dei suoi recettori tirosina chinasi su cellule del sistema immunitario, ovvero sui monociti-macrofagi (Lu e Lemke, 2001; Lemke e Lu, 2003). Inoltre in recenti studi di knockout per i recettori del Gas6, i topi mutati esprimono marcate alterazioni immunitarie. Queste vanno dall'elevata suscettibilità allo shock endotossico dopo inoculo di LPS, con aumentata produzione di citochine proinfiammatorie (in particolare di TNF- α), a manifestazioni autoimmunitarie croniche (Lu e Lemke, 2001; Lemke e Lu, 2003). Si è osservato, infatti, che nei topi mutati i linfociti, sono iperproliferanti e iperattivi come dimostrato dall'elevata espressione di marcatori della risposta acuta (ad es. CD 69, IFN- γ , FAS, IL-2 receptor) e cronica (ad es. CD44). Inoltre, linfociti normali trasferiti dai topi wild ai topi mutati sviluppano le medesime alterazioni, mentre linfociti trasferiti dai topi mutati ai topi wild non portano nessuna conseguenza per questi ultimi. In considerazione del fatto che i linfociti non esprimono né il Gas6 né i suoi recettori è stato proposto che le alterazioni dei linfociti fossero determinate dall'alterazione di altri sistemi. È emerso infatti che i monociti-macrofagi di tali topi mantengono uno stato di attivazione costitutiva, e presentano fagocitosi inefficace. Inoltre i macrofagi ottenuti da topi mutati, quando stimolati con LPS, esprimono livelli inusualmente alti di nuclear factor (NF)- κ B, e i topi sono ipersensibili allo shock endotossico, al danno tissutale e alla morte dovuti al picco di TNF- α LPS-indotto (Camenish et al., 1999; Cohen et al., 2002; Scott et al., 2001; Lu e Lemke, 2001; Lemke e Lu, 2003). I markers di attivazione dei monociti-macrofagi, inclusa l'espressione di MHC classe II e B7 co-receptors di superficie, sono espressi costitutivamente sulle cellule dei topi mutati, che producono anche livelli più elevati di citochine infiammatorie (comprese TNF- α e IL-12). Questi stessi macrofagi non sono inoltre in grado di fagocitare timociti apoptotici in studi in vitro (Lu e Lemke, 2001; Lemke e Lu, 2003).

L'attivazione costitutiva del sistema immunitario presente in questi topi, inoltre, conduce allo sviluppo di manifestazioni autoimmuni, le quali sono sovrapponibili ad alcuni quadri di malattie autoimmunitarie dell'uomo: artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico, sindrome di Sjögren e pemfigo volgare. Inoltre le femmine dei topi mutati risultavano più colpite rispetto ai maschi, come è descritto per le malattie autoimmuni umane. Tali manifestazioni sono accompagnate da titoli

anticorpali sierici elevati, diretti contro un'ampia gamma di autoantigeni quali dsDNA, collagene e fosfolipidi di membrana (Lu e Lemke, 2001; Lemke e Lu, 2003).

Infine i topi knockout per i recettori del Gas6 presentano danni tissutali, quali retinite pigmentosa, infertilità per degenerazione delle cellule germinali, perdita neuronale e iperplasia linfoide. E' interessante notare che nonostante tali topi sviluppino retinite pigmentosa, sia la proteina Gas6 sia i propri recettori non sono espressi dai fotorecettori, ma sono invece presenti sull'epitelio fagocitico pigmentato della retina (Lu et al, 1999). Tale evidenza supporta l'ipotesi che il sistema Gas6-recettori sia importante nella funzione delle cellule fagocitiche, mantenendo un controllo sull'omeostasi di alcuni tessuti, essenziale per il loro corretto funzionamento.

Ne consegue che le manifestazioni patologiche di tipo autoimmunitario espresse dai topi knockout, possano essere la conseguenza di una aberrazione funzionale del sistema monocito-macrofagico, con conseguente alterazione di un potenziale effetto di controllo (e non solo di attivazione) da parte di queste cellule sull'immunità cellulo-mediata.

Ulteriori studi hanno approfondito il meccanismo tramite cui la mancanza di uno o più recettori di Gas6 possa determinare l'attivazione macrofagica. Recentemente è stato dimostrato che le cellule apoptotiche inibiscono la produzione di citochine proinfiammatorie da parte delle cellule dendritiche tramite l'attivazione di Mer. Mer quindi attiverebbe il sistema PI3K/AKT determinando in ultimo l'inibizione dell'IKK (chinasi di I κ B), inibendo la liberazione di NF κ B dal complesso con I κ B e quindi inibendone la sua traslocazione nel nucleo con conseguente attivazione di trascrizione di geni di citochine proinfiammatorie tra cui il TNF- α (Sen et al., 2006).

Un altro studio ha invece evidenziato come l'espressione di Axl sia aumentata dalla stimolazione di monociti isolati con IFN- α e che il recettore Axl attivato determinerebbe l'espressione di Twist, un fattore di trascrizione che inibisce la trascrizione di TNF- α (Sharif et al., 2006).

Alla luce di queste premesse si può ipotizzare che il legame della proteina Gas6 con i propri recettori possa interferire direttamente con l'attivazione dei monociti-macrofagi riducendone la sensibilità allo stimolo proinfiammatorio, oppure attivando un segnale inibitorio che interferisca con l'attività degli stessi, una volta attivati, regolandone la risposta. Attraverso questa funzione Gas6 potrebbe esprimere un ruolo importante nel controllo dell'omeostasi del sistema immunitario.

Lo scopo del nostro studio è stato quindi quello di verificare un eventuale effetto modulatore della proteina Gas6 sulla attivazione e secrezione di citochine da parte di monociti-macrofagi.

Per tale obiettivo abbiamo adottato un sistema di coltura cellulare in vitro, utilizzando la linea cellulare neoplastica a differenziazione monocitaria U937, e ne abbiamo testato la risposta misurando la secrezione di TNF- α , IL-6, IL-1 β ed IL-10 dopo aver creato le condizioni di un insulto infiammatorio attraverso la stimolazione con LPS.

Il modello da noi proposto prevede infatti la differenziazione e lo stimolo di cellule U-937, una linea cellulare neoplastica umana di origine istiocitaria. Tali cellule presentano un blocco maturativo pertanto, non completando la differenziazione autonomamente, quando stimolate non sono in grado di rispondere allo stimolo con LPS, cioè non producono citochine. Questo è concorde con quanto emerge dai nostri esperimenti preliminari, nei quali le cellule che non hanno ricevuto differenziante non hanno mostrato secrezione di TNF- α .

Pertanto abbiamo indotto la differenziazione di tali cellule mediante opportune sostanze differenzianti quali il PMA e l'acido transretinoico. Le cellule che hanno ricevuto differenziante, dopo 5 giorni di incubazione hanno dimostrato un fenotipo macrofagico (aspetto morfologico macrofagico all'osservazione in microscopia ottica, ed adesione alle piastre di coltura) e pronta produzione di TNF- α dopo stimolo con LPS. Le cellule differenziate che non sono state stimolate (controllo negativo) non hanno mai prodotto citochine. Il differenziante più efficace, nei nostri esperimenti, si è dimostrato il PMA.

Tutti questi risultati sono in linea con i numerosi dati presenti in letteratura, confermando l'attendibilità di questo modello sperimentale. E' stato ampiamente dimostrato infatti, che tali cellule con opportuna differenziazione esprimono marcatori di superficie e presentano caratteristiche morfologiche e funzionali di tipo macrofagico, rendendo questa linea cellulare, previa opportuna differenziazione, un modello adeguato per lo studio della funzione dei macrofagi (Grolleau e Sonemberg, 1999; Joyce e Steer, 1992; Minta e Panbrun, 1985).

Dai risultati da noi ottenuti, la proteina Gas6 riduce significativamente la secrezione di due potenti citochine proinfiammatorie ovvero TNF- α e IL-6, oltre ad IL-1 β , e aumenta la secrezione di una citochina anti- infiammatoria quale IL-10.

Gas6 riduce la secrezione di TNF- α precocemente con effetto massimo tra le 6 e le 12 ore, con una riduzione massima del 47% a 12 ore, venendo a perdere efficacia alle 24 ore. Per quanto riguarda IL-6 l'effetto di Gas6, pur iniziando a manifestarsi a 6 ore, è massimo a 24 ore con una riduzione del 60% mentre scompare a 48 ore dalla stimolazione. Al contrario l'effetto di riduzione sulla produzione di IL-1 β è massimo (-35%) proprio a 48 ore.

Si parla invece di un innalzamento della concentrazione nei surnatanti per quanto riguarda IL-10, la quale risente maggiormente dell'effetto del Gas6 a 24 ore (+46%).

I risultati ottenuti sono in accordo con i modelli sperimentali di topi KO per i recettori del Gas6 in cui l'assenza di questi determinerebbe il venir meno di un sistema deputato al controllo dell'attivazione macrofagica. Tali animali infatti sviluppano shock endotossico letale e

manifestazione di iperattivazione cronica del sistema immunitario con autoimmunità (Lemke e Lu, 2003).

Risulta invece interessante analizzare quale sistema recettoriale sia coinvolto nell'espletare l'effetto sopra descritto. Sulla base dei risultati nel nostro modello sperimentale in presenza di anticorpi bloccanti i recettori Axl e Mer possiamo affermare che l'effetto biologico mediato da Gas6 nelle cellule U-937 sembrerebbe dipendente da Mer. Non possiamo escludere a priori un effetto mediato in parte anche dal recettore Tyro3, da noi non valutato, tuttavia non vi sono evidenze in letteratura sulla espressione di tale recettore nei monociti ne risulta un fenotipo significativo di alterata funzione macrofagica nei topi knock out solo per questo recettore che invece presentano gravissime disfunzioni neurologiche (Lemke e Lu, 2003); pertanto l'eventuale azione di tale recettore, anche se non escludibile a priori, pare piuttosto improbabile.

I nostri risultati sono stati inoltre ottenuti impiegando un anticorpo anti-Axl e un anticorpo anti-Mer commerciali, diretti esclusivamente contro la componente extracellulare dei rispettivi recettori e precedentemente testati in altri studi analoghi in altri tipi cellulari (piastrine) allo scopo di valutare quale recettore fosse coinvolto nella funzione biologica di Gas6; in tali studi è stato dimostrato che gli anticorpi non hanno un effetto stimolatorio diretto sui recettori, dato in accordo con i nostri risultati in cui la somministrazione di questi anticorpi non produce alterazioni nella secrezione di IL-6 nelle U-937 in coltura (Angelillo-Sherrer et al., 2005).

Inoltre la dimostrazione che Mer risulta essere fosforilato a 15 minuti dopo la stimolazione con Gas6 200 ng/ml e si mantenga fino a 60 minuti è prova ulteriore che la stimolazione con Gas6 nelle cellule U-937 determini l'attivazione di Mer, dato supportato anche dall'assenza di Axl nella sua forma fosforilata. Ciò avvalorava pertanto l'ipotesi che l'effetto biologico di Gas6 sulle U-937 sia completamente abolito dalla presenza di anticorpo inibente l'attivazione di Mer.

L'ipotesi che il sistema Gas6-Mer sia importante nella regolazione della secrezione di citochine da parte dei macrofagi trova importanti riscontri in letteratura. È stato infatti postulato che il recettore Mer fosse il più importante dal punto di vista funzionale per quanto riguarda le cellule monocitarie. Infatti le manifestazioni autoimmuni descritte nei topi knockout per i tre recettori di Gas6 si ottenevano, in buona parte, con la sola delezione di Mer. Anche se il fenotipo dei topi TAM risultava comunque avere le alterazioni più gravi dal punto di vista immunitario (Lu e Lemke, 2001; Lemke e Lu, 2003). Inoltre è stato recentemente dimostrato che le cellule apoptotiche, che legano e attivano Mer tramite residui di fosfatidilserina presenti sulla membrana (fenomeno di flip-flop), inibiscono la secrezione di TNF- α in cellule dendritiche tramite Mer e una cascata di segnalazione intracellulare attivata in conseguenza che viene ad interferire con la traslocazione di NFkB nel nucleo mediata dal sistema LPS/TLR. In particolare il segnale di Mer attiverebbe PI3K/AKT che inibirebbe l'attivazione della IKK (chinasi di I κ B) deputata alla liberazione di NFkB da un

complesso di proteine inibitorie (I κ B). In considerazione del fatto che la migrazione di NF κ B nel nucleo è il sistema principale tramite cui si esplica il segnale attivatorio di LPS/TLR, in pratica il segnale di Mer sembrerebbe inibire direttamente il sistema di trascrizione di mRNA di TNF- α mediato dal TLR (Sen et al., 2006).

La via di segnale sopra descritta per il recettore Mer nelle cellule dendritiche potrebbe avvenire anche nel nostro sistema sperimentale, in quanto la inibizione del TNF- α avviene tra le 6 e le 12 ore, periodo in cui la crescita della produzione di questa citochina è massima. Perciò tale effetto pare potenzialmente mediato da un'inibizione diretta dell'attivazione del monocita.

In apparente contrasto con tale interpretazione vi è il fatto che l'inibizione della secrezione di TNF- α è soltanto parziale. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che l'espressione recettoriale di Mer sia bassa in queste cellule e possa forse essere aumentata dopo molte ore di attivazione del macrofago o in presenza di altri stimoli (citochine immunomodulanti). Un'altra ipotesi potrebbe essere rappresentata dal fatto che Gas6/Mer potrebbero inibire solo la componente di attivazione del macrofago mediata da LPS/TLR; infatti LPS attiva molti altri sistemi recettoriali che quindi agirebbero svincolati da tale inibizione (Poltorak et al., 1998).

Invece il dato che Gas6, tramite Mer, inibisca la secrezione di IL-6 non trova altri riscontri in letteratura (fatta eccezione per il riscontro indiretto per i topi KO per Mer). Pertanto si possono fare soltanto supposizioni sulla via di traduzione intracellulare attivata dal legame Gas6/Mer. Naturalmente valgono, estensivamente, le ipotesi principali formulate per l'inibizione della secrezione di TNF- α in quanto il sistema LPS/TLR/NF κ B è descritto attivato anche nella secrezione di IL-6. Pertanto l'effetto inibitorio di Gas6 su IL6 potrebbe avvenire secondo meccanismi teorici analoghi a quelli del TNF- α . Infatti il ritardo con cui l'inibizione di IL-6 avviene rispetto al TNF è solo apparente in quanto l'effetto di Gas6 si viene a manifestare nel momento in cui la secrezione di IL-6 è in maggior crescita ovvero tra le 6 e le 24 ore come capita per il TNF- α ; semplicemente la cinetica di secrezione di IL-6 è più lenta rispetto al TNF- α (Mosser, 2003).

Per porre chiarezza abbiamo ritenuto opportuno valutare i livelli di fosforilazione di proteine a valle dei TLR in assenza ed in presenza di Gas6. Martin et al., hanno dimostrato che in monociti isolati da prelievo di sangue periferico stimolati con LPS abbiamo la fosforilazione di GSK3 β mediata dall'asse PI3K-Akt e che l'attivazione della via, e la conseguente produzione di citochine pro- ed anti-infiammatorie, non è specifica di un solo TLR. Hanno inoltre visto che GSK3 β influisce sull'associazione di NF κ B e CREB, fattori di trascrizione che regolano rispettivamente la produzione di citochine pro- ed anti-infiammatorie, con CBP e che questa associazione è necessaria affinché esse siano attive all'interno del nucleo nel legare il DNA ed indurre la trascrizione.

I nostri risultati concordano con i dati pubblicati e sono inoltre volti a capire il ruolo di Gas6 nel contesto descritto. In particolare Gas6 influisce sui livelli di Akt e GSK3 β : un aumento del livello di fosforilazione della prima provoca una maggiore fosforilazione, con conseguente inibizione, della seconda. Poiché questa svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della risposta immunitaria, in quanto la sua inibizione provocherebbe lo switch da pro- ad anti-infiammatoria impedendo una cronicizzazione, il fatto che Gas6 la inibisca denota un ruolo anti-infiammatorio per la nostra proteina. A conferma di ciò ci sarebbe il fatto che i livelli di NF κ B, fattore di trascrizione di TNF- α ed IL-6, all'interno del nucleo nella sua forma attiva risulta inferiore nei campioni trattati con LPS e Gas6 rispetto al solo trattamento con LPS. Abbiamo inoltre dimostrato che la concentrazione di IL-10 nei surnatanti di cellule trattate con Gas6 è più elevata rispetto ai trattati con solo LPS. Questo dato è un'ulteriore prova dell'azione anti-infiammatoria che Gas6 avrebbe e trova una spiegazione ancora una volta nel lavoro sopra citato. Come già detto Martin et al. hanno dimostrato un duplice ruolo per GSK3: la sua inibizione se da un lato inibisce NF κ B, dall'altro andrebbe a favorire il legame di CREB a CBP e quindi permetterebbe un suo legame al DNA con conseguente attivazione della trascrizione del gene codificante per IL-10. Anche se fin'ora non abbiamo risultati che possano confermare questo dato, è plausibile pensare che Gas6, inibendo GSK, vada a favorire la trascrizione di IL-10, dato che confermerebbe ulteriormente la sua attività anti-infiammatoria.

Il ruolo di Gas6 nei processi patologici di attivazione macrofagica con liberazione di TNF- α , sembra essere inoltre confermato dai dati emersi in un altro recente studio clinico, in cui sono stati riscontrati valori plasmatici aumentati di Gas6 in pazienti affetti da sepsi severa (Borgel et al.) associati a elevazione dei valori di TNF- α rispetto a pazienti con altri tipi di insufficienza multiorgano con Gas6 intorno a 100 ng/ml. Questi valori di concentrazione sono in linea con le concentrazioni che noi abbiamo dimostrato essere efficaci nell'inibire la secrezione di TNF- α e di IL-6 tramite il recettore Mer. Il significato di questo aumento del Gas6 circolante potrebbe essere interpretato come un fenomeno di tipo compensatorio, ovvero un tentativo di auto inibizione della liberazione di TNF- α , e ciò rafforza la possibilità che la proteina eserciti un effetto modulatore sulla risposta immunitaria, ed abbia un significato anti-infiammatorio.

In conclusione in questo lavoro abbiamo dimostrato che la proteina Gas6 inibisce la liberazione di citochine pro-infiammatorie e favorisce la traduzione di citochine anti-infiammatorie da parte di una linea cellulare neoplastica umana a differenziazione macrofagica attraverso l'attivazione del recettore tirosina chinasi Mer, risultato che trova conferme anche su monociti isolati da prelievi di

sangue periferico. Abbiamo inoltre dimostrato che l'effetto riscontrato è dovuto all'attivazione del recettore Mer con conseguente inibizione della proteina chiave GSK3 β tramite Akt e con conseguente inibizione del fattore di trascrizione NF κ B.

In futuro verificheremo lo stato di attivazione dei fattori di trascrizione CREB ed AP1 in estratti nucleari e cercheremo di completare lo studio del segnale attivato dal recettore Mer dopo il legame con Gas6. Cercheremo inoltre di verificare a livello di quale proteina la cascata del segnale di Mer/Gas6 incontra, ed inizia a modificare, quella di TLR/LPS.

BIBLIOGRAFIA

- Alciato F., Sainaghi P.P., Castello L., Bergamasco L., Carnieletto S., Avanzi G.C. Development and validation of an E.L.I.S.A. method for detection of growth arrest specific 6 (GAS6) protein in human plasma (J Immunoassay Immunochem In press)
- Angelillo-Scherrer A, de Frutos PB, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts M, Herbert M, Collen D, Dahlback B, Carmeliet P. 2001. *Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protect mice against thrombosis*. Nature Medicine 7: 215-221.
- Angelillo-Sherrer A, Burnier L, Flores N, Savi P, DeMol M, Schaeffer P, Herbert JM, Lemke G, Goff SP, Matsushima GK, Shelton Earp H, Venis C, Hoylaerts MF, Plaisance S, Collen D, Conway EM, Wehrle-Haller B, Carmeliet P. 2005. *Role of Gas6 receptors in platelet signalling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy*. J Clin Invest 13: 1-10.
- Avanzi GC, Gallicchio M, Cavalloni G, Gammaitoni L, Leone F, Rosina A, Boldorini R, Monga G, Pegoraro L, Varnum B, Aglietta M. 1997. *GAS6, the ligand of Axl and Rse receptors, is expressed in hematopoietic tissue but lacks mitogenic activity*. Exp Hematol 25: 1219-1226.
- Avanzi GC, Gallicchio M, Bottarel F, Gammaitoni L, Cavalloni G, Buonfiglio D, Bragardo M, Bellomo G, Albano E, Fantozzi R, Garbarino G, Varnum B, Aglietta M, Saglio G, Dianzani U, Dianzani C. 1998. *GAS6 inhibits granulocyte adhesion to endothelial cells*. Blood 91: 2334-2340.
- Bautista, A. P., A. Schuler, Z. Spolarics, and J. J. Spitzer. 1991. *Tumour necrosis factor- α stimulates superoxide anion generation by perfused rat liver and Kupffer cells*. Am. J. Physiol 261: G891–G895.
- Bellosta P, Costa M, Lin DA, Basilico C. 1995. *The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding*. Mol Cell Biol 15: 614-625.
- Bellosta P, Zhang Q, Goff SP, Basilico C. 1997. *Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation*. Oncogene 15: 2387-2397.
- Borgel D, Clauser S, Bornstain C, Bieche I, Bissery A, Remones V, Fagon JY, Aiach M, Diehl JL. 2006. *Elevated growth-arrest-specific protein 6 plasma levels in patients with severe sepsis*. Crit Care Med 34: 219-222.
- Bowie, A., and L. A. O'Neill. 2000. *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products*. J. Leukoc. Biol 67: 508–514.

Camenisch TD, Koller BH, Earp HS, Matsushima GK. 1999. *A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF-alpha production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock.* J Immunol 162: 3498-3503.

Chen J, Carey K, Godowski PJ. 1997. *Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation.* Oncogene 14: 2033-2039.

Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Jennette JC, Roubey RA, Earp HS, Matsushima G, Reap EA. 2002. *Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase.* J Exp Med 196: 135-40.

Corradin, S. B., J. Maue^l, P. Gallay, D. Heumann, R. J. Ulevitch, and P. S. Tobias. 1992. *Enhancement of murine macrophage binding of and response to bacterial lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein.* J. Leukoc. Biol 52: 363–368.

D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, Vollrath D. 2000. *Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Mertk in the retinal dystrophic RCS rat.* Hum Mol Genet 9: 645-651.

Ferrero, E., C. L. Hsieh, U. Francke, and S. M. Goyert. 1990. *CD14 is a member of the family of the leucine-rich proteins and is encoded by a gene syntenic with multiple receptor genes.* J. Immunol 145: 331–336.

Ferrero, E., D. Jiao, B. Z. Tsuberi, L. Tesio, G. Wei Rong, and A. Haziot. 1993. *Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2380–2384.

Frank, M. M., L. F. Fries. 1991. *The role of complement in inflammation and phagocytosis.* Immunol. Today 12: 322–331.

Fridell YW, Villa J Jr, Attar EC, Liu ET. 1998. *GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells.* J Biol Chem 273: 7123-7126.

Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Vollrath D. 2000. *Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa.* Nat Genet 26: 270-271.

Galicchio M, Mitola S, Valdembrì D, Fantozzi R, Varnum B, Avanzi GC, Bussolino F. 2005. *Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor.* Blood 105: 1970-1976.

- Gegner, J. A., R. J. Ulevitch, and P. S. Tobias. 1995. *Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance: dual roles for LPS binding protein and membrane CD14*. J. Biol. Chem 270: 5320–5325.
- Godowski PJ, Mark MR, Chen J, Sadick MD, Raab H, Hammonds RG. 1995. *Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro 3*. Cell 82: 355-358.
- Goruppi S, Ruaro E, Schneider C. 1996. *Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts*. Oncogene 12: 471-480
- Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, Snodgrass HR, Earp HS. 1994. *Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer*. Cell Growth Differ 5: 1022.
- Grewe, M., R. Gausling, K. Gyufko, R. Hoffmann, and K. Decker. 1994. *Regulation of the mRNA expression for tumor necrosis factor in rat liver macrophages*. J. Hepatol. 20: 811–818.
- Grolleau A., Sonenberg N., 1999. *Differential regulation of 4E-BP1 and 4E-BP2, two receptors of translation initiation, during human myeloid cell differentiation*. J. Immunol 162: 3491-3497.
- Grube, B. J., C. G. Cochane, R. D. Ye, C. E. Green, M. E. McPhail, R. J. Ulevitch, and P. S. Tobias. 1994. *Lipopolysaccharide binding protein expression in primary human hepatocytes and HepG2 hepatoma cells*. J. Biol. Chem. 269: 8477–8482.
- Guttridge K.L., Luft J.C., Dawson T.L., Kozłowska E., Mahajan N.P., Varnum B., Earp H.S. 2002. *Mer receptor tyrosine kinase signaling*. J Biol Chem 277(27):24057-24066.
- Han, J., J. C. Mathison, R. J. Ulevitch, and P. S. Tobias. 1994. *Lipopolysaccharide (LPS) binding protein, truncated at Ile-197, binds LPS but does not transfer LPS to CD14*. J. Biol. Chem. 269: 8172–8175.
- Haziot, A., N. Hijiya, K. Schultz, F. Zhang, S. C. Gangloff, and S. M. Goyert. 1999. *CD14 plays no major role in shock induced by Staphylococcus aureus but down-regulates TNF-alpha production*. J. Immunol. 162: 4801–4805.
- Hiemstra, P. S., P. B. Eisenhauer, S. S. L. Harwig, M. T. Van Den Barselaar, R. Van Furth, and R. I. Lehrer. 1993. *Antimicrobial proteins of murine macrophages*. Infect. Immun. 61: 3038–3046.
- Hu X., Chen J., Wang L., Ivashkiv L.B. 2007. *Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor and ITAM-dependent pathways in macrophage activation*. j leukoc biol. 82:237-243

- Joyce DA., Steer JH. 1992. *Differentiation of the U-937 promonocytic cell line induced by phorbol myristate acetate or retinoic acid: effect of aurothiomalate*. Agents Actions. 37: 305-310.
- Lamping, N., A. Hoess, B. Yu, T. C. Park, C. Kirschning, D. Pfeil, D. Reuter, S. D. Wright, F. Herrmann, and R. R. Schumann. 1996. *Effects of site-directed mutagenesis of basic residues (arg 94, lys 95, lys 99) of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation*. J. Immunol. 96: 4648-4656.
- Lemke G, Lu Q. 2003. *Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors*. Curr Opin Immunol 15: 31-36.
- Leturcq, D. J., A. M. Moriarty, G. Talbott, R. K. Winn, T. R. Martin, and R. J. Ulevitch. 1996. *Antibodies against CD14 protect primates from endotoxin-induced shock*. J. Clin. Invest. 98: 1533–1538.
- Li R, Chen J, Hammonds G, Phillips H, Armanini M, Wood P, Bunge R, Godowski PJ, Sliwkowski MX, Mather JP. 1996. *Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells*. J Neurosci. 16: 2012-2019.
- Lichtman, S. N., J. Wang, and J. J. Lemasters. 1998. *Lipopolysaccharide-stimulated TNF- α release from cultured rat Kupffer cells: sequence of intracellular signaling pathways*. J. Leukoc. Biol. 64: 368–372
- Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, Lai C, Skinner MK, Klein R, Matsushima GK, Earp HS, Goff SP, Lemke G. 1999. *Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis*. Nature 398: 723-728.
- Lu Q, Lemke G. 2001. *Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family*. Science. 293: 306-311.
- Luster, M. I., D. R. Germolec, T. Yoshida, F. Kayama, and M. Thompson. 1994. *Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver*. Hepatology 19:480–488.
- Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. 1993. *The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade*. Mol Cell Biol, 1993; 13: 4976-4985.
- Mark MR, Scadden DT, Wang Z, Gu Q, Goddard A, Godowski PJ. 1994. *Rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain*. J Biol Chem. Apr 8;269(14):10720-8.

- Martin M., Rehani K., Jope R.S., Michalek S.M. 2005. *Tool-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen syntase kinase 3*. Nat Immunol. 6:777-784
- Mayer, A. M. S., and J. A. Spitzer. 1991. *Continuous infusion of Escherichia coli endotoxin in vivo primes superoxide anion release in rat polymorphonuclear leukocytes and Kupffer cells in a time-dependent manner*. Infect. Immun. 59:4590–4598.
- Melaragno MG, Wuthrich DA, Poppa V, Gill D, Lindner V, Berk BC, Corson MA. 1998. *Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats*. Circ Res. Oct 5;83(7):697-704.
- Meyer, J., F. Hinder, J. Stothert Jr, L. D. Traber, D. N. Herndon, J. T. Flynn, and D. L. Traber. 1994. *Increased organ blood flow in chronic endotoxemia is reversed by nitric oxide synthase inhibition*. J. Appl. Physiol. 76:2785–2793.
- Migging S.M., O'Neill L.A.J. 2006. *New insights into the regulation of TLR signaling*. J Leukoc Biol. 80:220-226
- Minta JO., Panbrun L., 1985. *In vitro induction of cytologic and functional differentiation of the immature human monocyte-like cell line U-937 with PMA*. Amj. Pathol. 119(1):111-26.
- Moore, R. N., K. J. Goodrum, and L. J. Berry. 1976. *Mediation of an endotoxic effect by macrophages*. J. Reticuloendothel. Soc. 19:187–197.
- Mosser DM. 2003. *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol 73: 209-212.
- Nakano T, Higashino K, Kikuchi N, Kishino J, Nomura K, Fujita H, Ohara O, Arita H.J 1995. *Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors*. Biol Chem. Mar 17;270(11):5702-5.
- Nakano T, Kawamoto K, Kishino J, Nomura K, Higashino K, Arita H. 1997. *Requirement of gamma-carboxyglutamic acid residues for the biological activity of Gas6: contribution of endogenous Gas6 to the proliferation of vascular smooth muscle cells*. Biochem J. Apr 15;323 (Pt 2):387-92.
- Neubauer A, Fiebeler A, Graham DK, O'Bryan JP, Schmidt CA, Barckow P, Serke S, Siegert W, Snodgrass HR, Huhn D, et al. 1994. *Expression of axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis*. Blood. Sep 15;84(6):1931-41.

- Neubauer A, Burchert A, Maiwald C, Gruss HJ, Serke S, Huhn D, Wittig B, Liu E. 1997. *Recent progress on the role of Axl, a receptor tyrosine kinase, in malignant transformation of myeloid leukemias*. Leuk Lymphoma. Mar;25(1-2):91-6.
- O'Donnell K, Harkes IC, Dougherty L, Wicks IP. 1999. *Expression of receptor tyrosine kinase Axl and its ligand Gas6 in rheumatoid arthritis: evidence for a novel endothelial cell survival pathway*. Am J Pathol. Apr;154(4):1171-80.
- Pengal R.A., Ganesan L.P., Wei G., Fang H., Ostrowski M.C., Tridandapani S. 2006. *Lipopolysaccharide-induced production of interleukin-10 is promoted by serine/threonine kinase Akt*. Mol Immunol. 43:1557-1564.
- Pereira, H. A., P. Moore, and P. Grammas. 1996. *CAP37, a neutrophil granule-derived protein stimulates protein kinase C activity in endothelial cells*. J. Leukoc. Biol. 60:415–422.
- Pollack, M., C. A. Ohl, D. T. Golenbock, F. Di Padova, L. M. Wahl, N. L. Koles, G. Guelde, and B. G. Monks. 1997. *Dual effects of LPS antibodies on cellular uptake of LPS and LPS-induced proinflammatory functions*. J. Immunol. 159:3519–3530.
- Poltorak, A., I. Smirnova, X. He, M. Y. Liu, C. Van Huffel, O. McNally, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, X. Du, P. Thompson, E. K. Chan, J. Ledesma, B. Roe, S. Clifton, S. N. Vogel, and B. Beutler. 1998. *Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region*. Blood Cells Mol. Dis. 24:340–355.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. V. Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler. 1998. *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science 282:2085–2088.
- Poussin, C., M. Foti, J. L. Carpentier, and J. Pugin. 1998. *CD14-dependent endotoxin internalization via a macropinocytic pathway*. J. Biol. Chem. 273:20285–20291.
- Prieto AL, Weber JL, Tracy S, Heeb MJ, Lai C. 1999. *Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system*. Brain Res. Jan 23;816(2):646-61.
- Ramadori, G., K. H. Meyer zum Buschenfelde, P. S. Tobias, J. C. Mathison, and R. J. Ulevitch. 1990. *Biosynthesis of lipopolysaccharide-binding protein in rabbit hepatocytes*. Pathobiology 58:89–94.

- Roitt, I. M. 1994. *Immunity to infection*, p. 243–271. In I. M. Roitt (ed.), *Essential immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
- Schneider C, King RM, Philipson L. 1988. *Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells*. *Cell*,; 54: 787-793.
- Schumann, R. R., and J. Zweigner. 1999. *A novel acute-phase marker: lipopolysaccharide binding protein (LBP)*. *Clin. Chem. Lab. Med.* 37:271–274.
- Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, Earp HS, Matsushima GK. 2001. *Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER*. *Nature*. May 10;411(6834):207-11.
- Sen P, Wallet MA, Yi Z, Huang Y, Henderson M, Mathews CE, Earp HS, Matsushima G, Baldwin Jr AS, Tisch RM. 2006. *Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF- κ B activation in dendritic cells*. *Blood*. [Epub ahead of print]
- Sharif MN, Sosic D, Rothlin CV, Kelly E, Lemke G, Olson EN, Ivashkiv LB. 2006. *Twist mediates suppression of inflammation by type I IFNs and Axl*. *J Exp Med*. 203: 1891-1901.
- Stefanova, I., V. Horejsi, I. J. Ansotegui, W. Knapp, and H. Stockinger. 1991. *GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases*. *Science* 254:1016–1019.
- Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF, et al. 1995. *The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases*. *Cell*. Feb 24;80(4):661-70.
- Sundstrom C, Nilsson K. 1976. *Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937)*. *Int J Cancer* 15: 565-77.
- Theofan, G., A. H. Horwitz, R. E. Williams, P. S. Liu, I. Chan, C. Birr, S. F. Carroll, K. Me'sza'ros, J. B. Parent, H. Kasler, S. Aberle, P. W. Trown, and H. Gazzano-Santoro. 1994. *An amino-terminal fragment of human lipopolysaccharide-binding protein retains lipid A binding but not CD14-stimulatory activity*. *J. Immunol.* 152:3623–3629.
- Thompson DA, McHenry CL, Li Y, Richards JE, Othman MI, Schwinger E, Vollrath D, Jacobson SG, Gal A. *Retinal dystrophy due to paternal isodisomy for chromosome 1 or chromosome 2, with homoallelism for mutations in RPE65 or MERTK, respectively*. *Am J Hum Genet*. 2002 Jan;70(1):224-9.

Tobias, P. S., and R. J. Ulevitch. 1993. *Lipopolysaccharide binding protein and CD14 in LPS dependent macrophage activation*. Immunobiology 187: 227–232.

Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell YW, Hunt RW, Trail G, Clogston C, Toso RJ, et al. 1995. *Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6*. Nature. Feb 16;373(6515):623-6.

Vreugdenhil, A. C. E., A. M. Snoek, C. van't Veer, J. W. Greve, and W. A. Buurman. 2001. *LPS-binding protein circulates in association with apoBcontaining lipoproteins and enhances endotoxin-LDL/VLDL interaction*. J. Clin. Investig. 107:225–234.

Wan, Y., P. D. Freeswick, L. S. Khemlani, P. H. Kispert, S. C. Wang, G. L. Su, and T. R. Billiar. 1995. *Role of lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats*. Infect. Immun. 63:2435–2442

Wang, J. H., H. P. Redmond, Q. D. Wu, and D. Bouchier-Hayes. 1998. *Nitric oxide mediates hepatocyte injury*. Am. J. Physiol. 275:G1117–G1126.

Yanagita M, Arai H, Nakano T, Ohashi K, Mizuno K, Fukatsu A, Doi T, Kita T. 2001. *Gas6 induces mesangial cell proliferation via latent transcription factor STAT3*. J Biol Chem. Nov 9;276(45):42364-9.

Yanagita M, Ishimoto Y, Arai H, Nagai K, Ito T, Nakano T, Salant DJ, Fukatsu A, Doi T, Kita T. 2002. *Essential role of Gas6 for glomerular injury in nephrotoxic nephritis*. J Clin Invest. Jul;110(2):239-46.

ATTIVITA'FORMATIVA

Seminari Primo Anno

“Mechanism of osteolytic lesion in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation”

Relatrice: Prof. Maria Grano

Dipartimento di Anatomia e Istologia, Facoltà di Medicina,
Università di Bari

“Il carcinoma del colon”

Relatrice: Dott. Furlan

Organizzatore: Prof. Guido Monga

“New perspectives in metabotropic glutamate receptors neurobiology”

Relatore: Prof. Ferdinando Nicoletti

Ordinario di Farmacologia

Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia, Ia Facoltà di Medicina e Chirurgia,
Università “La Sapienza”, Roma

“Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico”

Relatore: Prof. Daniele Sblattero

Dipartimento di Scienze Mediche

Università del Piemonte Orientale

“Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare genica dell'emofilia”

Relatrice: Dott. Antonia Follenzi

“The natural course of preclinical type 1 diabetes”

Relatore: Prof. Mikael Knip

Professor of Pediatrics

Hospital for Children and Adolescents

University of Helsinki, Finland

“La prevenzione della trasmissione verticale di HIV in Africa Sub Sahariana. L’esperienza del programma DREAM (Drug Resource Enhancement against AIDS and Malnutrition)”

Relatrice: Dott. Susanna Ceffa

Dpt. Of Oncology, Div. Of Surgical, Molecular and Ultrastructural Pathology

University of Pisa and Pisa University Hospital

Comunità di Sant’Egidio – DREAM Program

“Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative”

Relatrice: Dott. Daniela Cilloni

Divisione di Ematologia

Università degli Studi di Torino (Polo San Luigi – Orbassano)

“Sperm mediated gene transfer: storia e applicazioni”

Relatrice: Marialuisa Lavitrano

Università di Milano Bicocca

“DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccine design”

Relatrice: Dott. Renata Grifantini

Research Director

Novartis – Vaccines

Siena

“The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis”

Relatore: Prof. Dieter Bromme, Ph.D.

University of British Columbia

Faculty of Dentistry

Canada

Seminari Secondo Anno

“Stem cells in cardiac pathophysiology and treatment”

Relatore: Dott. Paolo Di Nardo

Laboratorio di Cardiologia Molecolare e Cellulare

Dipartimento di Medicina Interna

Facoltà di Medicina e Chirurgia,

Università Tor Vergata, Roma

“Creazione di *antigen protein microarray* a fini di ricerca e diagnostica”

Relatrice: Dott. Paola Secco

“Patogenesi molecolare dei linfomi associati ad immunodeficienza”

Relatrice: Dott. Daniela Capello

“Modulazione funzionale del canale cardiaco Kv4.3 da parte di subunità accessorie”

Relatore: Dott. Diego Cotella

“Studio di fattori genetici coinvolti nella suscettibilità alla Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)”

Relatrice: Dott. Lucia Corrado

“Gene silencing by RNA interference (RNAi)”

Relatrice: Prof. Paola Defilippi

Centro di Biotecnologie Molecolari

Università di Torino

“Detection of miRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3'-UTR regions”

Relatore: Prof. Michele Caselle

Università di Torino

“The long hand of the small RNAs reaches into several levels of gene regulation”

Relatore: Prof. Carlo Cogoni

European Brain Research Institute

Università La Sapienza, Roma

“Human Cytomegalovirus (HCMV) from clinic to the bench and return”

Relatore: Prof. Thomas Mertens

Istituto di Virologia

Università di Ulm

“La valutazione del controllo nervoso della circolazione in clinica: dalla teoria alle applicazioni pratiche”

Relatore: Prof. Massimo Pagani

Professore Ordinario di Medicina Interna

Università di Milano

“Fragile X syndrome from RNA metabolism impairment to spine dysmorphogenesis”

Relatrice: Prof. Claudia Bagni

Dipartimento di Biologia

Università Tor Vergata, Roma

IRCCS S.Lucia

“Relazioni tra struttura e funzione delle proteine mediante analisi del protein data base”

Relatore: Dott. Marco Milanese

DISTA

Università del Piemonte Orientale

Alessandria

“Difetti genetici del pre-B cell receptor ”

Relatrice: Dott. Simona Ferrari

Università di Bologna

“The regulation of hematopoietic stem cells by SMAD signaling”

Relatore: Prof. Stefan Karlsson

Professor of Molecular Medicine

Molecular Medicine and Gene Therapy

Lund Strategic Center for Stem Cell Biology and Cell Therapy

Lund University, Sweden

“Translating basic science into therapeutic strategies for shwachman diamond syndrome”

Relatore: Prof. Steven R. Ellis

Department of Biochemistry and Molecular Biology

University of Louisville

Louisville KY 40202 USA

“Sindromi autoinfiammatorie”

Relatore: Dott. Alberto Martini

Università di Genova

“Bioinformatic tools for the analysis of UTRs and for the prediction of alternative spliced transcripts”

Relatore: Dott. Flavio Mignone

Dipartimento di Chimica Strutturale e Stereochimica Inorganica

Università di Milano

SEZIONE 2:

CORSI FREQUENTATI

Primo anno

Corso di inglese tenuto dal Prof. Irving-Bell

Secondo anno

Corso di statistica tenuto dal Prof. Magnani

CONGRESSI FREQUENTATI (elenco completo: denominazione congresso, sede, data)

Primo anno

“L’influenza aviaria”

Organizzatore: dott. Ferri Marco

Presso Albergo Italia, Novara

2 Febbraio 2006

“AIDS: il silenzio continua”

Organizzazione: Health Data, Torino

Chairman Dott. Giovanni Rizzo

Direttore Scientifico Prof. Di Perri

Presso Auditorium BPN, Novara

4 Ottobre 2005

Secondo anno

Annual European Congress of Rheumatology, Barcellona 13-16 Giugno 2007

COMUNICAZIONI A CONGRESSI (elenco completo: autori, titolo, denominazione congresso, sede, data)

A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

Sainaghi P.P, **Alciato F.**, Sola D., Castello L., Bergamasco L., Avanzi G.C. Gas6 modulates cytokines secretion in U-937 (human monocyte-like cell line) with an anti-inflammatory effect. Ann rheum dis. 2007 July. 66 Suppl II :150

Annual European Congress of Rheumatology, Barcellona 13-16 Giugno 2007

B) Altre comunicazioni

Sainaghi P.P., Collimedaglia L., **Alciato F.**, Leone M.A., Puta E. Naldi P., Castello L., Monaco F., Avanzi G.C. Elevation of Gas6 protein concentration in cerebrospinal fluid of patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). Eur J Neurol. 2007 Aug. 14 Suppl I:126

Congress of the European Federation of Neurological Societies, Brussels 25-28 Agosto 2007

Sainaghi P.P., **Alciato F.**, Carnieletto S., Massarotti M., Sola D., Castello L., Inglese E., Bellomo G., Avanzi G.C. Measurement of Gas6 protein in patient with acute dispnea. Eur Resp J. 2007 Sept. 30 Suppl 51:51s

17th European Respiratory Society Annual Congress, Stoccolma 15-19 Settembre 2007

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO (elenco completo)

Alciato F., Sainaghi P.P., Castello L., Bergamasco L., Carnieletto S., Avanzi G.C. Development and validation of an E.L.I.S.A. method for detection of growth arrest specific 6 (GAS6) protein in human plasma (J Immunoassay Immunochem In press)

Sainaghi P.P., Collimedaglia L., **Alciato F.**, Leone M.A., Puta E. Naldi P., Castello L., Monaco F., Avanzi G.C. Elevation of Gas6 protein concentration in cerebrospinal fluid of patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). (J Neurol Submitted for publication)

