

**Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
*Ciclo XXII***

Relazione 2° anno

**TITOLO:
Ruolo della proteina Gas6 come inibitrice
della neo-angiogenesi tumorale**

Candidato: Dott. Pier Paolo Sainaghi
Tutor: Prof. Gian Carlo Avanzi

SEZIONE 1 RISULTATI SCIENTIFICI

INTRODUZIONE

La neoangiogenesi tumorale.

Un tumore primitivo riesce a utilizzare ossigeno e nutrienti per diffusione fino a quando ha un diametro di 1-2 mm, ma per accrescersi ulteriormente necessita di un adeguato apporto ematico tramite la formazione di nuovi vasi. Tale processo viene definito neoangiogenesi, ovvero l'espansione della rete vascolare a partire da vasi preesistenti (Risau W, 1997).

Dapprima si verifica un aumento della della sintesi proteica da parte della cellula endoteliale, che attiva la degradazione della membrana basale e della matrice extracellulare, quindi la cellula endoteliale migra e prolifera nella matrice circostante, permettendo la formazione di "sprouts" o prolungamenti del vaso principale che si accresceranno ulteriormente. Infine l'interazione tra i componenti della matrice extracellulare (ECM) e le integrine espresse sulla membrana plasmatica consente alla cellula endoteliale la sopravvivenza e la regolazione della sintesi di recettori per i fattori di crescita. La cellula endoteliale cambia forma, assumendo una struttura tubulare in risposta a segnali della matrice e a fattori angiogenetici attivatori ed inibitori. Infine con la deposizione della membrana basale intorno al vaso neoformato, ed il reclutamento di cellule accessorie quali periciti e cellule muscolari lisce, che stabilizzano la struttura, si completa il processo di maturazione e rimodellamento vasale che porta alla formazione definitiva del nuovo vaso, che tuttavia presenta un andamento irregolare, un aumento della permeabilità, una membrana basale ridotta ed un aumento della proliferazione cellulare (Risau W, 1997; Darland DC e D'Amore PA, 1999; Carmeliet P, 2000). Questa fase del processo tumorigenico è stata definita come "switch" angiogenetico e la riuscita dell'intero processo è possibile grazie al rilascio da parte del tumore di attivatori diffusibili dell'angiogenesi (Hanahan D e Folkman J, 1996).

Molti sono i fattori coinvolti nel fenomeno angiogenetico, si ricorda tuttavia soprattutto in questo contesto la famiglia del Vascular Endotelial Growth Factor (VEGF). La famiglia del VEGF è composta da diverse proteine denominate VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, la più importante delle quali è sicuramente VEGF-A. Esistono diverse isoforme di VEGF-A che differiscono per il numero di residui amminoacidici e per le proprietà chimiche e di localizzazione nei vari tipi cellulari. Sono stati identificati tre recettori per la famiglia dei

VEGF, di tipo tirosin chinasi, denominati VEGFR-1 a cui si legano VEGF-A e VEGF-B; VEGFR-2 a cui si legano VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, e VEGFR-3 i cui ligandi sono VEGF-C e VEGF-D. VEGFR-1 e VEGFR-2 sono ampiamente presenti sull'endotelio vascolare, mentre VEGFR-3 è presente sull'endotelio del sistema linfatico (Carmeliet P, 2000). Gli effetti biologici di VEGF sono diversi in funzione del tipo di recettore con il quale interagisce. Mentre l'interazione del VEGF-A con VEGFR-2 è seguita in vitro da proliferazione, migrazione e "sprouting" delle cellule endoteliali e contribuisce alla formazione di strutture tubulari, nessun effetto mitogeno segue il legame di VEGF con VEGFR-1. Questa seconda interazione attiva invece la via del fosfatidil inositolo (PI3) e pare essere coinvolta in fasi più tardive dell'angiogenesi, ossia nel rimodellamento e nella stabilizzazione dei vasi. Studi condotti su topi knock-out per VEGFR-1, infatti, hanno evidenziato la perdita dell'organizzazione morfologica con cellule endoteliali in eccesso nel lume dei canali vascolari (Fong GH et al, 1995). VEGFR-1 può essere considerato un antagonista di VEGFR-2, perché sequestrando il VEGF blocca il segnale di trasduzione attraverso il VEGFR-2, risultando un regolatore negativo dell'angiogenesi (Ferrara N et al, 2003).

Il VEGF viene iperespresso da diversi tipi cellulari di tumori quali il carcinoma prostatico, le neoplasie della vescica, il neuroblastoma, il carcinoma del colon-retto, il carcinoma della cervice uterina, il carcinoma mammario, le neoplasie della laringe, il carcinoma a cellule renali, il mieloma multiplo, il sarcoma di Kaposi, il carcinoma dell'esofago, l'epatocarcinoma, i tumori polmonari non a piccole cellule, alcuni tumori endocrini, il melanoma e molti altri ancora (Masabumi S, 2003; Turner HE et al, 2003).

Gas6

Il gene Gas6 è stato identificato e clonato nel 1988 insieme ad altri 5 geni caratterizzati dall'essere espressi durante la fase G0 del ciclo cellulare in fibroblasti murini e denominato Growth Arrest Specific Gene 6 (Schneider C et al, 1988). Nel 1993 è stato clonato il gene umano del Gas6. Si compone di 2556 nucleotidi e codifica per una proteina secreta (Manfioletti G et al, 1993). Gas6 è espresso in vari tessuti murini (SNC, cellule del Sertoli e del Leydig, cellule endoteliale, precursori emopoietici mieloidi, cellule stromali midollari, monociti, VSMCs) (Lu Q et al, 1999; Prieto AL et al, 1999; Avanzi GC et al, 1998; O'Donnell H et al 1999, Nakano T et al, 1995) e umani (epitelio intestinale, midollo osseo, cellule endoteliali, VSMCs, tessuto ematopoietico, fibroblasti) (Manfioletti G et al, 1993; Avanzi GC et al, 1997 e Melaragno MG et al, 1998).

Gas6 è una proteina composta di motivi strutturali caratteristici: un dominio amino-terminale γ -carbossilato, seguito da quattro sequenze ripetute EGF-like e da un doppio dominio globulare carbossi-terminale. Gas6 è un membro della famiglia delle proteine vitamina K dipendenti, infatti, per la sua attività è necessaria la γ -carbossilazione dei residui di acido glutammico dei domini globulari carbossi-terminali. Presenta analogie (identità al 44%) di sequenza con la proteina S, una proteina plasmatica che regola negativamente la coagulazione, e in minor percentuale con una proteina coinvolta nel trasporto di ormoni steroidei, la SHBG (Sex Hormones Binding Globulin) (Manfioletti G et al, 1993 e Joseph DR, 1997).

Gas6 lega con differente affinità, i membri di una famiglia di recettori tirosin-chinasici (RTKs) i cui membri sono Axl, Tyro-3 e Mer (Varnum BC et al, 1995; Stitt TN et al, 1995; Godowsky PJ et al, 1995; Chen J et al, 1997). Il recettore Axl è quello dotato di maggiore affinità per Gas6. E' presente nel tessuto emopoietico normale e neoplastico, in cellule endoteliali, fibroblasti, condrociti, VSMCs e nei monociti del sangue periferico (O'Bryan Jp et al, 1991; Neubauer A et al, 1994). Il recettore Tyro-3 è espresso in particolare nel sistema nervoso centrale, mentre Mer è presente sui monociti circolanti, in precursori ematopoietici midollari.

Gas6 e angiogenesi

I vasi possono essere un bersaglio dell'asse Gas6/Axl, essendo entrambe molecole espresse dalle cellule endoteliali (EC) (Manfioletti G et al, 1993; Manzow S et al, 1996), dai periciti (Collett G et al, 2003) e dalle cellule muscolari lisce (Melaragno MG et al, 1998). Inoltre la sopravvivenza dei vasi risulta alterata nei topi knock-out per i geni Ark, Rse, Mer (Prieto AL et al, 1999).

In un recente studio, è stato indagato il ruolo dell'asse Gas6/Axl nell'angiogenesi, dimostrando in vitro che Gas6 può inibire l'attivazione delle cellule endoteliali dipendente da VEGFR-2 (Gallicchio M et al, 2005). In vitro infatti Gas6 è risultato inibire la chemiotassi delle EC dipendente da VEGF-A e la morfogenesi delle cellule endoteliali su Matrigel impedendo la differenziazione in reti tubulari geometriche con massimo effetto inibitorio alla concentrazione 80-100 ng/ml. Inoltre Gas6 è risultato inibire la vascolarizzazione dipendente dal VEGF-A in vivo nel modello di membrana corion-allantoidea di embrione di pollo (CAM) alla concentrazione di 20 ng/spugna.

Modelli di studio della neoangiogenesi.

Esiste una grande varietà di metodi descritti, sia in vivo che in vitro.

I modelli dell'angiogenesi in vitro si focalizzano sulla misurazione della migrazione, proliferazione e tubulizzazione delle cellule endoteliali in risposta agli agenti esogeni stimolatori o inibitori. I saggi in vitro sono rapidi, quantificabili e riproducibili. Tuttavia non esiste attualmente in vitro un modello che simuli completamente il processo angiogenetico ovvero che oltre alla cellule endoteliali valuti anche le cellule di supporto (i periciti, le cellule muscolari lisce, i fibroblasti e, nel caso dei tumori, le cellule neoplastiche), la matrice extracellulare, le vicine cellule mesenchimali e la circolazione sanguigna (Staton CA et al, 2004).

In vivo, invece, sono presenti tutti i componenti del processo, ma vi sono limitazioni legate allo specifico microambiente, ai siti di inoculo, alle specie usate e al modo di somministrazione della sostanza da testare. Il modello "Plug di Matrigel" fornisce in vivo un microambiente naturale per l'angiogenesi; Matrigel è una matrice extracellulare prodotta dal sarcoma murino di Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), costituita in modo predominante da laminina (60%), collagene IV (30%), nidogeno (5%) eparan-solfati, proteoglicani (3%) ed entactina (1%). In questa matrice le cellule endoteliali coltivate in vitro attecchiscono e rapidamente formano tubuli (in 4-12 ore). Recentemente è stata sviluppata una forma di Matrigel depletato di fattori di crescita che evita i problemi associati alla forte stimolazione che le cellule endoteliali subiscono nel primo caso. Il Matrigel è allo stato liquido a 4°C e solidifica rapidamente a temperature superiori. Questa caratteristica peculiare lo rende particolarmente adatto all'inoculo in animali da esperimento; allo stato liquido può essere mescolato ai reagenti da saggiare nel corso dell'esperimento ed una volta iniettato sottocute, solidifica rapidamente a costituire una massa omogenea, detta "plug" che può essere asportata dopo il sacrificio dell'animale al termine dell'esperimento. I limiti del Matrigel risiedono nel fatto che è costoso e richiede tempo e numerosi esperimenti per la messa a punto (Staton CA et al, 2004).

Altri modelli in vivo molto promettenti sono l'"Angiomouse", utilizzato per impiantare linee cellulari transfettate con GFP in modo che le reti vascolari appaiono scure in campo verde (tumore impiantato); il metodo permette una visualizzazione non invasiva dell'angiogenesi e soprattutto in tempo reale utilizzando un microscopio stereotassico a fluorescenza. (Staton CA et al, 2004)

SCOPO DEL LAVORO

Il processo angiogenetico è noto come fattore favorente la progressione neoplastica (Folkman J, 1995). Il VEGF rappresenta uno dei più studiati e principali mediatori della neoangiogenesi tumorale; esso favorisce la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali e contribuisce alla formazione di strutture tubulari tramite interazione con il VEGFR-2 (Ferrara N, 2002).

È inoltre stato dimostrato che VEGF viene iperespresso da diversi tipi di tumori umani e che la sua iperespressione favorisce la resistenza al trattamento citotossico, sia chemio che radioterapico e la crescita tumorale e il potenziale invasivo-metastaticizzante. Questo ha portato a considerare la terapia antiangiogenica come elemento importante nel trattamento di molte neoplasie (Folman J, 1995).

Gas6, una proteina di 75 KDa, è risultata in uno studio in vitro inibire l'angiogenesi VEGF dipendente attraverso un meccanismo di defosforilazione del VEGFR-2 tramite il recettore Axl e la proteina fosfatasi SHP-2. Inoltre Gas6 è risultato inibire l'angiogenesi VEGF dipendente "in vivo" nel saggio della membrana corion-allantoidea di pollo (Gallicchio et al., 2005).

Sulla base di queste premesse si può ipotizzare che Gas6 possa essere un potenziale inibitore anche della neoangiogenesi tumorale VEGF dipendente.

Lo scopo del presente studio è quindi quello di valutare l'effetto della proteina Gas6 verso l'angiogenesi tumorale VEGF dipendente "in vivo" ed in particolare nel modello murino di angiogenesi con "matrigel plug".

Gli obiettivi del progetto saranno quindi i seguenti:

- **Confermare l'effetto della proteina Gas6 rispetto all'angiogenesi VEGF dipendente nel modello murino di "matrigel plug".**

Tale conferma risulta necessaria in quanto il modello murino di matrigel plug permette di simulare il processo di invasione vascolare di una matrice fibro-connettivale preesistente; evento simile a quanto avviene nell'angiogenesi tumorale in cui si osserva la migrazione di nuovi vasi all'interno di tessuti preesistenti.

- **Valutare l'effetto della proteina Gas6 rispetto all'angiogenesi tumorale VEGF dipendente nel modello murino di "matrigel plug".**

Tale obiettivo verrà valutato analizzando l'effetto di Gas6 sulla neoangiogenesi indotta mediante impianto diretto di cellule tumorali wild type (wt) e trasfettate per overesprimere Gas6 singeniche con i topi C57BL/6 e inoculo del surnatante da coltura cellulare delle stesse nel matrigel plug. Inoltre si valuterà l'effetto di Gas6 sia somministrato nel plug di matrigel sia per via parenterale.

- **Valutare l'effetto della proteina Gas6 rispetto alla crescita tumorale di linee tumorali produttrici di VEGF in modelli murini "in vivo".**

Tale obiettivo verrà valutato analizzando l'effetto di Gas6 sulla crescita di neoplasie ottenute da inoculo sottocutaneo di linee tumorali produttrici di VEGF wt e trasfettate per overesprimere Gas6. Ove opportuno il Gas6 verrà somministrato per via intraperitoneale.

- **Valutare l'effetto di gas6 nel controllo dell'angiogenesi patologica VEGF dipendente non-neoplastica.**

Valutazione dell'effetto di Gas6 nel controllo dell'angiogenesi VEGF dipendenti in modelli animali di processi infiammatori cronici, per esempio l'artrite indotta da collagene.

MATERIALI E METODI

a) esperimenti in vitro.

Materiali

- Linea cellulare B16F0 (melanoma cutaneo murino non metastatizzante) (cortesemente donata dal prof. Kairbaan M. Hoidivala-Dilke, St. Thomas Hospital, London, U.K.);
- linea cellulare DU145 (carcinoma prostatico metastatizzante umano) (ICLC – Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro – Genova);
- linea cellulare MDA-MB-231 (adenocarcinoma mammario umano metastatizzante) (ICLC – Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro – Genova);
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (SIGMA-ALDRICH – St. Louis, MO, USA), RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (SIGMA-ALDRICH – St. Louis, MO, USA), FBS al 10% (Foetal Bovine Serum) (GIBCO – Auckland, N.Z.), L-Glutamina 2 mM (MERK – Germany), NaHCO₃ allo 0,37%, penicillina G-sodica 100 UI/ml (BIOPHARMA – Roma, Italia) e streptomicina 100 µg/ml (BRISTOL-MYERS SQUIBB – Sermoneta (LT), Italia);
- piastre per colture cellulari 100 mm (IWAKI - Giappone);
- PBS 1x EDTA 0,02% [10% di PBS 10x (80 mg/ml di NaCl, 2 mg/ml di KCl, 11,4 mg/ml di NaH₂PO₄, 2 mg/ml di KH₂PO₄, portando a pH 7,2-7,3), 90% di H₂O deionizzata e 0,02% di EDTA];
- tripsina 0,5% (Fluka BioChemika – Svizzera)/EDTA 0,25% in PBS 1x.
- ELISA Kit Mouse VEGF (Alpha Diagnostic International,, USA);
- ELISA Kit Human VEGF (R&D System, USA);
- rhGas6 (R&D system, USA);
- Angiokit (TCS Cell Works Ltd, U.K.);
- rhVEGF (R&D System, USA);
- suramina (TCS Cell Works Ltd, U.K.);
- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (0,2 mg/ml di KCl, 0,2 mg/ml di KH₂PO₄, 8 mg/ml di NaCl, 1,15 mg/ml di Na₂HPO₄), usato come washing buffer;

Metodi

Raccolta surnatante di cellule neoplastiche umane esprimenti VEGF

Circa 1×10^6 cellule (DU 145 o MDA-MB-231) vengono piastrate in fiasche T75 con RPMI1640 (DU 145) o DMEM (MDA-MB-231) addizionati con FBS 10% fino al raggiungimento della confluenza (circa 3-4 gg); quindi il terreno viene rimosso, vengono eseguiti n°3 lavaggi con PBS per rimuovere tracce di siero e viene aggiunto terreno di coltura (RPMI1640 o DMEM rispettivamente) senza siero (6 ml/fiasca). Quindi le fiasche vengono lasciate in incubatore per 72 ore, quando il surnatante viene rimosso, quindi centrifugato a 1500 rpm per rimuovere detriti cellulari e aliquotato in tubi sterili da microcentrifuga e quindi congelato a -30°C .

Quindi viene misurata la concentrazione di VEGF umano nei surnatanti ottenuti con kit ELISA (R&D System, USA) seguendo le istruzioni del produttore.

Valutazione dell'angiogenesi VEGF dipendente "in vitro" con angiokit.

L'Angiokit è un modello in vitro per analizzare le proprietà pro ed anti-angiogenetiche di determinate molecole. Le cellule endoteliali umane vengono coltivate in un apposito medium insieme con fibroblasti umani. Questi ultimi formano una matrice che guida la crescita e la migrazione delle cellule endoteliali, inizialmente organizzate in piccole isole, e la successiva formazione dei tubuli. Questi tubuli si sviluppano gradualmente e, dopo 9-11 giorni dall'inizio della coltura, si anastomizzano e risultano positivi per CD31. L'Angiokit è formato da colture in crescita al primo stadio di sviluppo del tubulo, in una piastra da 24 pozzetti, cui andranno aggiunti, ad ogni cambio di terreno, i vari composti inibenti e stimolanti la neovascolarizzazione che si vogliono testare. Si preparano quindi nel medium le diluizioni dei composti da testare, raccogliendole preliminarmente in apposite provette e si sostituisce quindi il medium esistente. Si approntano opportuni controlli positivi (rhVEGF 2 ng/ml) e negativi (suramina 20 $\mu\text{M}/\text{ml}$). Ad ogni cambio di terreno si esaminano le colture al microscopio, per monitorizzare la formazione dei tubuli vascolari.

Trascorsi 11 giorni si procede alla valutazione dell'angiogenesi in ciascun pozzetto, con metodo ELISA e con immunocistochimica, mediante anticorpi per la visualizzazione dei tubuli.

Per prima cosa si procede alla fissazione delle cellule, togliendo il terreno, lavando ogni pozzetto con washing buffer, aggiungendo 1 ml di fissativo (etanolo al 70%, conservato a -20°C ed utilizzato freddo) ed incubando a temperatura ambiente per 30 minuti. Successivamente si aspira il fissativo e si aggiunge l'anticorpo primario *mouse anti-human*

CD31 in blocking buffer e si incuba per 60 minuti a 37°C. Quindi si aggiunge l'anticorpo secondario (*goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate*), diluito in blocking buffer. Si incuba ancora per 60 minuti a 37°C. Dopo ogni passaggio si lavano i pozzetti per tre volte con H₂O distillata a temperatura ambiente.

A questo punto si procede al test ELISA. In una piastra da 96 pozzetti si preparano 50 pozzetti con 25 µl di NaOH 3M e in 2 si aggiunge 100 µl di soluzione p-NPP (bianco). Questo substrato solubile viene preparato dissolvendo una pastiglia di p-nitrofenolfosfato ed una di Tris buffer (entrambe fornite nel kit) in 20 ml di H₂O distillata. Ad ogni pozzetto dell'Angiokit si aggiungono quindi 0,3 ml di soluzione p-NPP e si incuba a 37°C per 20 minuti. Quindi, da ogni pozzetto della piastra di coltura dell'angiokit si prelevano due aliquote da 100 µl che vengono aggiunte nei pozzetti della piastra multi-well da 96 contenenti NaOH. Successivamente si effettua la lettura spettrofotometrica a 405 nm (packard bell).

Previo ulteriore lavaggio dei pozzetti dell'angiokit per tre volte con H₂O distillata, si procede alla valutazione immunocistochimica. Ad ogni well dell'Angiokit si aggiungono 0,5 ml di substrato insolubile, preparato dissolvendo due pastiglie di BCIP/NBT (fornite nel kit) in 20 ml di H₂O distillata e filtrando la soluzione così ottenuta. Si incuba poi la piastra a 37°C, finché i tubuli non diventano viola (5'-15', massimo 30'). Si effettua un altro lavaggio dei pozzetti e poi questi sono pronti per essere osservati al microscopio.

b) esperimenti in vivo

Animali

- Topi C57BL/6NCrIBR di sesso maschile, età 6 settimane (Charles River Laboratories, Lecco, Italia)

Sostanze e reagenti

- Grow Factor Reduced Matrigel Matrix (Becton Dickinson Italia).
- Gas6 murino ricombinante (R&D Systems Italia)
- VEGF-A164 murino ricombinante (R&D Systems Italia)
- Ematossilina ed eosina
- Drabkin's Reagent (1 g/l di NaHCO₃, 200 mg/l di potassio ferricianato e 50 mg/l di potassio cianato) (Sigma, Italia).

- Emoglobina Bovina (Sigma, Italia).

Cellule

- Linea cellulare B16F0 di melanoma murino non metastatizzante secernente VEGF (ICLC, Genova, Italia).

Materiale di consumo ed apparecchiature

- Microscopio Olympus BX 51
- Fotocamera digitale Olympus C-3030 ADU
- Microtomo a slitta
- Spettrofotometro, Beckton Dickinson.

Preparazione surnatante di cellule neoplastiche murine.

3 milioni di cellule B16F0 sono state piastrate in fiasche T75 e fatte amplificare in presenza di DMEM con FBS 10%. Giunte a confluenza dopo 3 gg le cellule sono state lavate con PBS e starvate con DMEM senza FBS. Dopo 3 giorni il surnatante è stato raccolto. Quindi è stato eseguito il dosaggio del VEGF murino mediante kit ELISA commerciale ottenendo una concentrazione massima di ≈ 100 ng/ml.

Saggio di angiogenesi con matrigel plug.

Numerosi esperimenti preliminari sono stati condotti per mettere a punto le seguenti variabili sperimentali: il volume minimo di matrigel da inoculare per avere dati ripetibili, la concentrazione dei fattori proangiogenetici, il tempo necessario di impianto delle masse per ottenere un'angiogenesi valutabile, le procedure di analisi dei risultati.

Qui di seguito sono riportate solo le condizioni sperimentali al termine della messa a punto del metodo.

Il Matrigel, conservato allo stato solido a -20°C , viene scongelato lentamente a 4°C . Mediante l'uso di pipettatore con puntali pre-refrigerati a 4°C , viene prelevata la quantità di Matrigel necessaria per l'esperimento. I campioni vengono allestiti in sterilità mediante l'uso di cappa a flusso laminare. Tutte le tappe di allestimento dei campioni vengono eseguite in ghiaccio al fine di mantenere il Matrigel allo stato liquido.

Il matrigel allo stato liquido viene addizionato con le molecole favorevoli l'angiogenesi (rmVEGF 100 ng/ml, surnatante cellule B16F10 alla diluizione 1:5 - Valutazioni preliminari

istologiche e con dosaggio dell'Hb su plug di matrigel hanno evidenziato un'intensa vascolarizzazione, superiore a quella indotta utilizzando esclusivamente VEGF, pertanto il surnatante è stato testato nel plug di matrigel utilizzando una diluizione 1:5 in matrigel per una concentrazione di VEGF circa di 20 ng/ml -) in presenza/assenza della proteina Gas6 (rmGas6 500 ng/ml). Ogni esperimento viene condotto in presenza degli opportuni controlli negativi (solo matrigel e solo rmGas6). Le singole provette vengono agitate mediante Vortex, in modo da rendere omogenea la diffusione dei diversi fattori nella matrice. Aliquote di 350 µl (primi 3 esperimenti) quindi di 500 µl (tutti gli esperimenti successivi) dei diversi preparati di Matrigel vengono trasferite mediante aspirazione molto lenta, per non generare bolle, in siringhe da 1 ml dotate di ago 25 Gauge, pre-refrigerate a 4°C. Le siringhe vengono dotate di un codice e poste in ghiaccio in attesa dell'inoculo.

I topi vengono anestetizzati uno alla volta mediante esposizione a vapori di etere per circa 30-45". Una volta anestetizzato, l'animale viene tenuto per coda e collottola da un operatore. Un secondo operatore esegue l'inoculo nel sottocute in sede interscapolare. Dopo l'iniezione l'ago viene mantenuto in sede per 10". Gli animali vengono riposti quindi nelle gabbie precedentemente allestite (una per ogni gruppo sperimentale).

Al settimo giorno o al quindicesimo giorno dall'inoculo i topi vengono sacrificati mediante dislocazione cervicale previa anestesia. Viene eseguito un taglio della cute dorsale a losanga. I lembi cutanei vengono scollati dal sottocute sino ad esposizione delle masserelle di Matrigel che risultano facilmente visibili e vengono isolate dai tessuti circostanti. Viene eseguita una accurata rimozione dei tessuti circostanti le masse di matrigel.

Saggio di angiogenesi con matrigel plug utilizzando linee cellulari tumorali.

Alcuni esperimenti preliminari sono stati condotti per mettere a punto le seguenti variabili sperimentali: il numero minimo necessario di cellule tumorali per creare una rete vascolare quantificabile, il numero massimo di tali cellule per evitare la sostituzione del matrigel da parte di tessuto tumorale e il tempo di permanenza delle masse inoculate. Qui di seguito sono riportate solo le condizioni sperimentali al termine della messa a punto del metodo.

Il matrigel viene preparato come descritto sopra.

Dopo tripsinizzazione e lavaggio in PBS previa conta con emocitometro 350 cellule B16F0 vengono risospese in 100 µl di RPMI e successivamente addizionate a 400 µl di matrigel liquido a 4 °C in provette sterili da microcentrifuga in presenza o assenza di rmGas6 500 ng/ml. Opportuni controlli (solo matrigel e rmGas5 500 ng/ml) vengono approntati. Quindi il

contenuto viene aspirato in siringhe da 1 mg con ago da 25 gauge prerrefrigerate a 4°C. le siringhe vengono quindi lasciate in ghiaccio fino all'inoculo.

Si esegue quindi l'inoculo come sopra riportato e l'asportazione delle masse dopo 15 giorni come sopra descritto.

Quantificazione della neoangiogenesi.

Tecnica istopatologica.

Le masse asportate vengono poste in apposite biocassette contrassegnate da un codice di identificazione e quindi immerse in soluzione tamponata di formalina al 4% per la fissazione.

Dopo 24 ore i campioni vengono processati per l'inclusione in paraffina.

Dopo l'inclusione, previo raffreddamento del blocchetto istologico in congelatore a -20°C per 30', vengono tagliate con microtomo sezioni di spessore variabile tra 3 e 5 µm, posizionate su vetrino e fissate mediante incubazione in termostato a 60°C per 15 min. I vetrini vengono contrassegnati con gli stessi codici riportati sulle biocassette.

Successivamente le sezioni vengono sparaffinate e rese idrofile mediante bagni in concentrazioni scalari decrescenti prima di xilolo e poi di etanolo. A questo punto viene eseguita colorazione con ematossilina di Mayer ed eosina, mediante apparecchio automatico Zeiss Micron. I vetrini vengono infine disidratati in scala di alcoli, chiarificati in xilolo e montati in balsamo. Le sigle di identificazione dei vetrini vengono oscurate con etichette adesive sulle quali viene riportata una numerazione casuale in modo che i campioni non siano riconoscibili durante le valutazioni.

I vetrini, dunque, vengono osservati in cieco da due operatori mediante microscopio ottico (Olympus BX 51). Viene effettuata una visione d'insieme per stabilire l'idoneità del campione (vengono esclusi i campioni in cui l'area di matrigel è inferiore ad 1 campo ottico 100x, oppure i campioni con più di 3 frammentazioni per campo ottico a 100x). Se il campione viene considerato idoneo all'analisi, vengono selezionate le 5 aree più vascolarizzate (hot spots) e analizzate ciascuna a 200x. Dalla valutazione di tali aree viene assegnato un punteggio da 0 a 4 utilizzando la seguente scala di valutazione morfologica modificata da Weidner (1991):

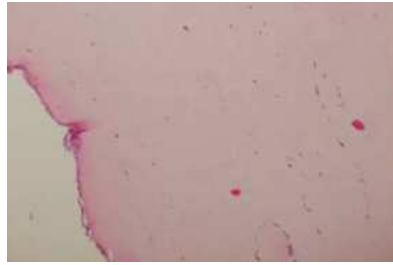
0: assenza o rare cellule

1: presenza di cellule non organizzate

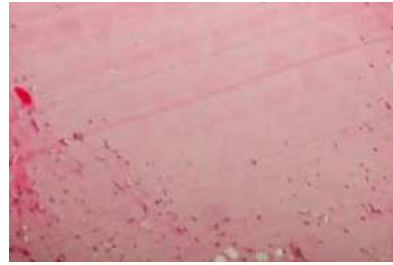
2: presenza un fronte compatto di infiltrazione cellulare o formazioni tubulari senza lume (cordone con più di 5 cellule).

3: riscontro di vasi formati con lume visibile, ma assenza di globuli rossi

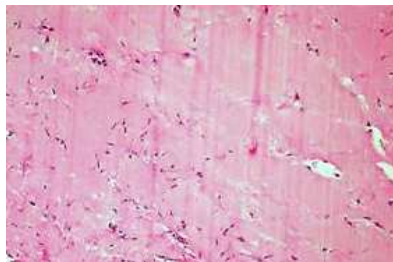
4: presenza di vasi canalizzati e interconnessi tra loro, con globuli rossi nel lume



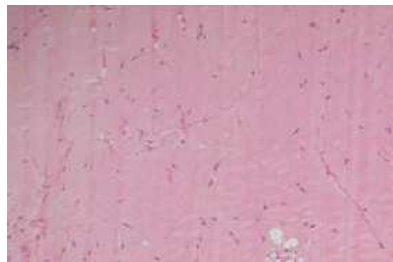
0



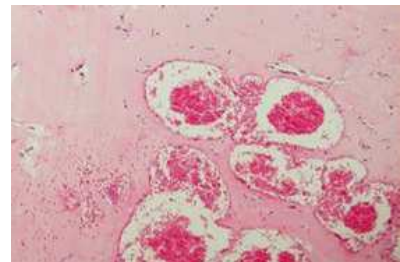
1



2



3



4

Viene quindi calcolato uno score medio per ciascun campione (punteggi delle 5 hot spots I operatore + punteggi delle 5 hot spots II operatore / 10) che viene utilizzato per l'analisi successiva. I codici dei vetrini vengono, a questo punto, decriptati ed i dati inseriti in un foglio di calcolo elettronico per l'analisi statistica mediante opportuno software.

In esperimenti preliminari è stato controllato lo score ottenuto su sezioni colorate con ematosilina-eosina con sezioni parallele dopo colorazione istologica con soluzione tricromica di Masson e con colorazione istochimica con anticorpo anti CD-31. Non sono state evidenziate significative differenze nella quantificazione dell'angiogenesi tra questi tipi di colorazioni. Pertanto si è proceduto con la colorazione in ematosilina-eosina che è risultata più ripetibile, uniforme e di più semplice esecuzione rispetto alle altre metodiche

Tecnica di dosaggio dell'emoglobina.

Al momento dell'espanto ciascuna massa viene diluita 1:2 in acqua deionizzata ed è lasciata a 4°C overnight. Il giorno successivo, i campioni sono agitati su vortex, dopodichè la dissoluzione completa è facilitata mediante pipettate ripetute. Eventuali residui vengono eliminati mediante centrifugazione.

Per la determinazione quantitativa della concentrazione dell'emoglobina nelle masse si utilizza il Drabkin's Reagent (1 g/l di NaHCO₃, 200 mg/l di potassio ferricianato e 50 mg/l di potassio cianato). Viene preparata una curva standard, con emoglobina bovina in soluzione di Drabkin alle seguenti concentrazioni: 0 – 60 – 120 – 180 mg/ml.

Quindi si aggiunge la soluzione di Drabkin, con diluizione 1:2, a ciascun campione. Quindi i campioni sono ulteriormente centrifugati, il surnatante è diluita 1:12 in soluzione di Drabkin. Dopo 15 minuti a temperatura ambiente viene misurata l'assorbanza con lo spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 540 nm. La concentrazione dell'emoglobina viene calcolata mediante interpolazione con la curva standard mediante regressione lineare.

Analisi statistica.

La presenza di differenze dotate di significatività statistica tra le variabili dei diversi gruppi viene valutata mediante test-T di Student per campioni indipendenti e analisi della varianza ANOVA con test post hoc di Tuckey (differenze statisticamente significative per valori di $p < 0,05$)

Trasfezione della line tumorale B16F0 con il gene mGa6.

Clonaggio del gene gas6 murino nel vettore di espressione pcDNA 3.1 (+)

Reagenti

- Plasmide pCMV-SPORT6 contenente il gene gas6 murino (mgas6), clonato tra gli enzimi di Sal I – Not I del “Multiple Cloning site” (MCS).
- Plasmide pcDNA 3.1 (+) (INVITROGEN - USA) con gene per resistenza ad ampicillina e geneticina.
- Enzimi di restrizione ECOR I e NOT I (NEW ENGLAND BIOLABS, USA).
- Agarosio (BIO-RAD - USA).
- Tampone acetato TAE (reagenti per 1 litro di soluzione: 40 mM TRIS, 5mM NaAc, 1 mM EDTA).

- Kit di estrazione DNA da gel di agarosio “NucleoSpin Extract 2 in 1” (MACHEREY-NAGEL - Germania).
- Enzima T4 DNA LIGASI (CLONTECH – USA).
- Batteri *Escherichia Coli* competenti DH5- α (Invitrogen, USA).
- “SOB Medium” (reagenti per 1 litro di soluzione: 20 g di Bacto-Peptone; 5 g di Bacto Yeast Extract; 0,5 g di NaCl; 10 ml di KCl 250 mM; 5 ml di MgCl₂ 2 M) utilizzato per la crescita dei batteri.
- Ampicillina (IBIMICYN - Milano) alla concentrazione di 100 μ g/ml.
- Piastre di Petri da 9 cm per batteri (Bibby Sterilin - Milano).
- Kit per lisi alcalina di batteri, estrazione e purificazione di DNA “NucleoBond Nucleic Acid Purification Tools” (CLONTECH - USA).

Metodi

Il plasmide di trasporto pCMV-SPORT6, contenente il cDNA del gene Gas6 murino è stato sottoposto a taglio enzimatico con gli enzimi di restrizione ECO RI e NOT I. Il plasmide pcDNA 3.1 (+) è stato tagliato nel multiple cloning site con gli stessi enzimi di restrizione (incubazione a 37° nel buffer fornito con l’enzima di restrizione e con BSA per 1 ora). I prodotti delle reazioni di taglio sono stati separati mediante elettroforesi in gel di Agarosio all’1% in tampone acetato (TAE). Quindi le bande corrispondenti al plasmide pcDNA 3.1 (+) linearizzato e al gene Gas6, sono state escisse dal gel ed è stato estratto il loro DNA con un Kit specifico (“Nucleo Spin Extract) secondo le istruzioni del produttore. Dopo aver eluito il DNA dei campioni in 25-50 μ l di “NE buffer” dello stesso kit, sono state calcolate, previa misurazione della concentrazione dei frammenti mediante spettrofotometro le quantità stimate di DNA per eseguire la reazione di ligasi utilizzando l’enzima T4 DNA LIGASI a temperatura ambiente per circa 1 ora in apposito buffer fornito con l’enzima.

Quindi si procede alla trasformazione dei batteri competenti (*Escherichia Coli* DH-5 α). Per ogni reazione vengono utilizzate aliquote di 50 μ l di batteri DH-5 α pari a 1×10^5 cfu (Colony Forming Unit) e vengono aggiunti in queste ultime aliquote, 5 μ l di reazione di ligasi. La soluzione così ottenuta viene lasciata in ghiaccio per 20 minuti. In seguito viene effettuata la procedura “HEAT SHOCK”, che consiste nell’incubare le provette a 42° C per 2 minuti e poi successivamente in ghiaccio per un altro minuto. In seguito a questa procedura, è stato aggiunto alle stesse provette 1 ml di “SOB Medium” riscaldato a 37° C e le cellule sono state lasciate crescere in un agitatore a 37° C per 45 minuti a 300 giri. Quindi le provette,

contenenti la sospensione di batteri vengono centrifugate per 3 minuti a 4000 giri; dopodiché il sedimento ottenuto viene risospeso nel SOB restante dopo l'eliminazione del surnatante, e la sospensione che ne risulta viene dispersa su piastre di Petri da 9 cm di diametro contenenti "SOB Medium" + BACTO-AGAR all'1% e con l'antibiotico ampicillina alla concentrazione finale selettiva di 100 µg/ml. Le piastre così ottenute vengono incubate a 37° C per tutta la notte e il giorno dopo si verifica visivamente la crescita delle colonie. Le colonie presenti vengono raccolte isolatamente con un puntale sterile e trasferite in recipienti falcon sterili con 5 ml di "SOB Medium" (Mini-Prep) addizionato dell'antibiotico ampicillina alla concentrazione selettiva di 100 µg/ml. Le aliquote sono lasciate crescere a 37° C in un agitatore a 300 giri per tutta la notte. Il giorno successivo si procede alla lisi alcalina dei batteri con apposito kit per mini prep "NucleoBond Nucleic Acid Purification Tools". Il DNA plasmidico estratto è sottoposto a taglio con enzimi di restrizione precedentemente utilizzati per verificare l'avvenuto clonaggio (liberazione del gene mgas6). Successivamente i batteri delle colonie risultate positive dopo la mappa di restrizione, sono fatti crescere in 200 ml di SOB Medium (Maxi-Prep) sempre con AMPICILLINA alla concentrazione precedente per ottenere maggiori quantità di DNA plasmidico (estratto dai batteri come per le mini prep). Infine il DNA plasmidico amplificato di ogni clone è stato sottoposto a sequenziamento per verificare il posizionamento "in frame" del gene. Sono stati quindi identificati ed isolati diversi cloni di pcDNA 3.1 (+) + "mGas6" tutti contenenti il gene completo orientato "in frame".

RISULTATI

Gas6 inibisce l'angiogenesi VEGF dipendente "in vivo".

Sono stati condotti esperimenti preliminari seriatati per mettere a punto le condizioni sperimentali ottimali del modello di "matrigel plug". I principali parametri di messa a punto del metodo sono stati i seguenti: titolazione della concentrazione di VEGF nei plug (50-75-100-150 ng/ml), permanenza del plug (7 giorni vs 10 e 15 gg), sede dell'inoculo (interscapolare vs inguinale). Le condizioni ottimali sono risultate le seguente: concentrazione VEGF 100 ng/ml, permanenza del plug di 7 gg, inoculo in sede interscapolare.

Gas6 è risultato ridurre significativamente l'angiogenesi VEGF dipendente nel modello di angiogenesi in vivo con matrigel plug. Tale risultato è stato confermato sia valutando i risultati dello score istologico sia quelli del dosaggio dell'emoglobina.

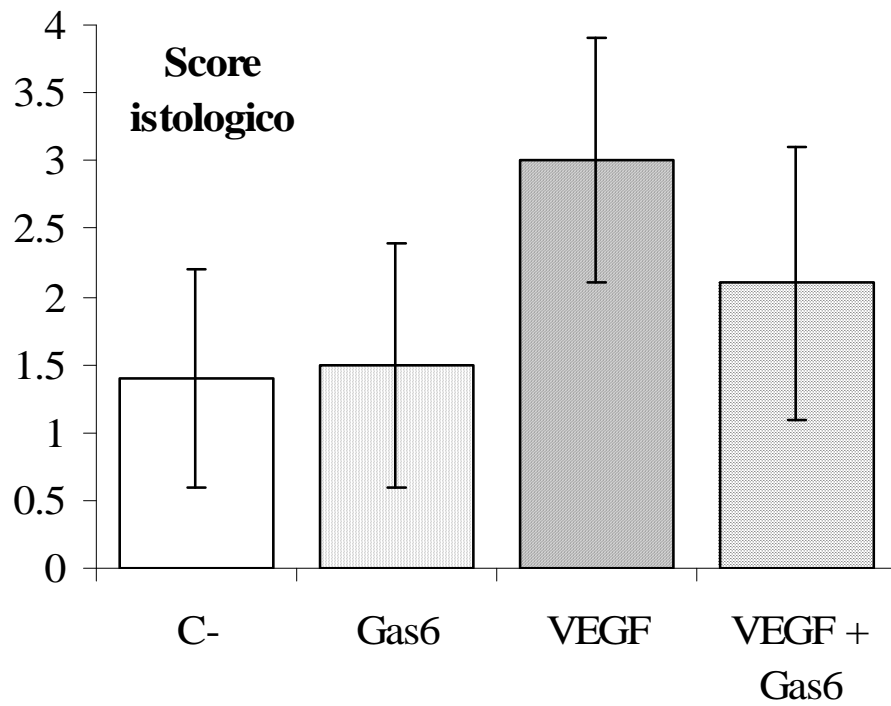
TECNICA ISTOLOGICA.

Sono stati condotti esperimenti seriatati (3 repliche di esperimenti, ogni caso eseguito in quadruplicato) per valutare l'efficacia dell'inibizione dell'angiogenesi VEGF da parte della proteina Gas6 mediante valutazione istologica.

Analizzando le medie degli scores istologici, si è evidenziata una modesta risposta angiogenetica nei controlli negativi ($1,4 \pm 0,8$) sostanzialmente invariata in presenza di Gas6 ($1,5 \pm 0,9$). In presenza di VEGF, alla concentrazione di 100 ng/ml, si è osservato come atteso un'incremento dello score medio di angiogenesi ($3,0 \pm 0,9$). Gas6 è risultato efficace nell'inibire l'angiogenesi VEGF mediata, con netta riduzione dello score ($2,1 \pm 1,0$). (**Figura 1a**). Tale riduzione è statisticamente significativa (Test post-hoc di Tukey, VEGF vs tutti i gruppi $p < 0,05$, gli altri confronti n.s.).

Analizzando la distribuzione di frequenza degli score bassi (< 2), intermedi (≥ 2 e < 4) e alti (≥ 4) con test χ^2 si osservano più frequentemente scores alti nel gruppo VEGF rispetto agli altri gruppi ($p < 0,05$). Inoltre non vi è alcuna differenza tra gli scores del gruppo VEGF+Gas6 rispetto ai controlli negativi. **Figura 1b**

a)



b)

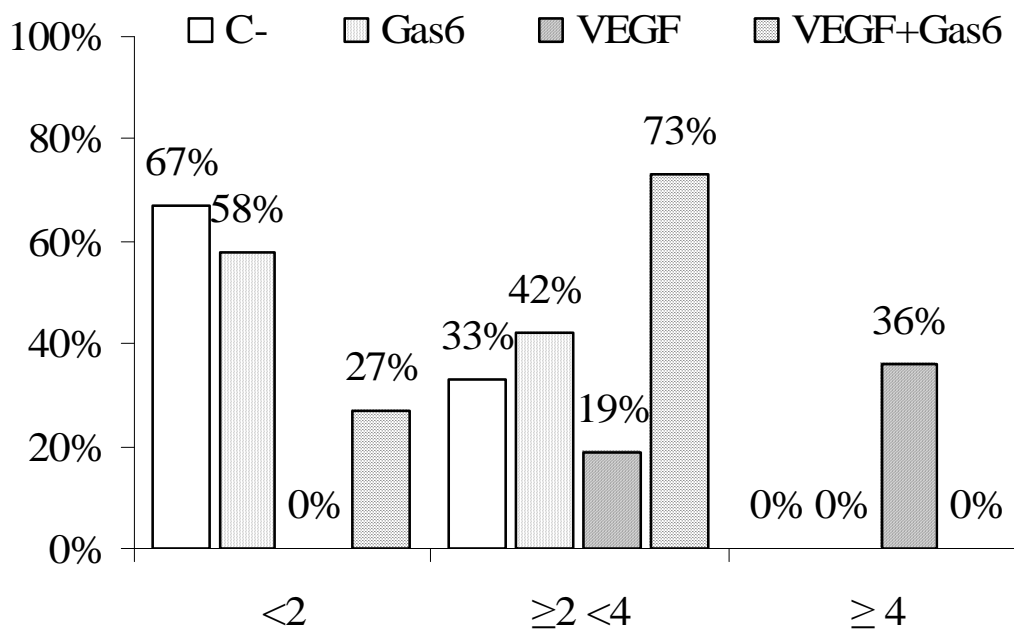


Fig.1 **Effetto di Gas6 su angiogenesi VEGF dipendente. Indagine istologica.** a) il grafico presenta le medie e le deviazioni standard degli score istologici dei vari gruppi considerati. b) Il grafico rappresenta la distribuzione di frequenza degli score bassi (<2), intermedi ≥ 2 e < 4, alti ≥ 4 tra i vari gruppi considerati.

TECNICA DI DOSAGGIO DELL'EMOGLOBINA

Abbiamo quindi verificato i risultati ottenuti con la valutazione istologica utilizzando la metodica di quantificazione della angiogenesi VEGF indotta nel plug di matrigel attraverso la quantificazione dell'emoglobina nella massa, espressa in concentrazione in rapporto al volume della stessa.

Abbiamo eseguito n°2 repliche sperimentali con ogni caso eseguito in triplicato e ulteriori 3 repliche sperimentali con ogni caso condotto in quadruplicato. Abbiamo confrontato i valori delle concentrazioni di Hb ottenute e delle variazioni percentuali delle stesse rispetto al controllo negativo.

Abbiamo confermato che Gas6 alla concentrazione di 500 ng/ml è risultato efficace nell'inibire l'angiogenesi VEGF indotta. La concentrazione media di Hb è risultata essere di 3.8 ± 1.2 mg/ml per il controllo negativo solo matrigel e 3.6 ± 1.0 per il controllo negativo matrigel + Gas6. In presenza di VEGF la concentrazione di Hb è risultata di 11.3 ± 3.00 mentre in presenza di VEGF + Gas6 di 4.1 ± 2.0 (Figura 2). Pertanto Gas6 ha determinato una riduzione del $74 \pm 13\%$ della concentrazione di emoglobina nei plug di matrigel. Tale riduzione è risultata statisticamente significativa (Test post hoc di Tukey, VEGF vs tutti i gruppi $p < 0.0002$). Gli altri confronti non sono risultati statisticamente significativi (figura 2 a e b).

Pertanto al termine di questa serie di esperimenti possiamo concludere che Gas6 inibisce l'angiogenesi indotta da VEGF in vivo.

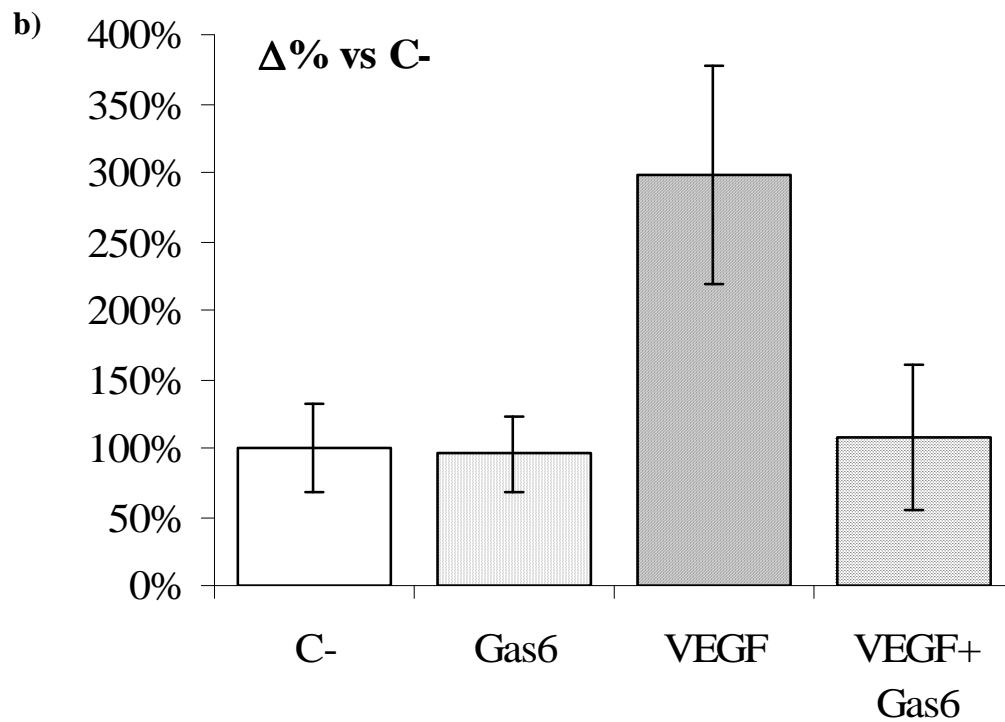
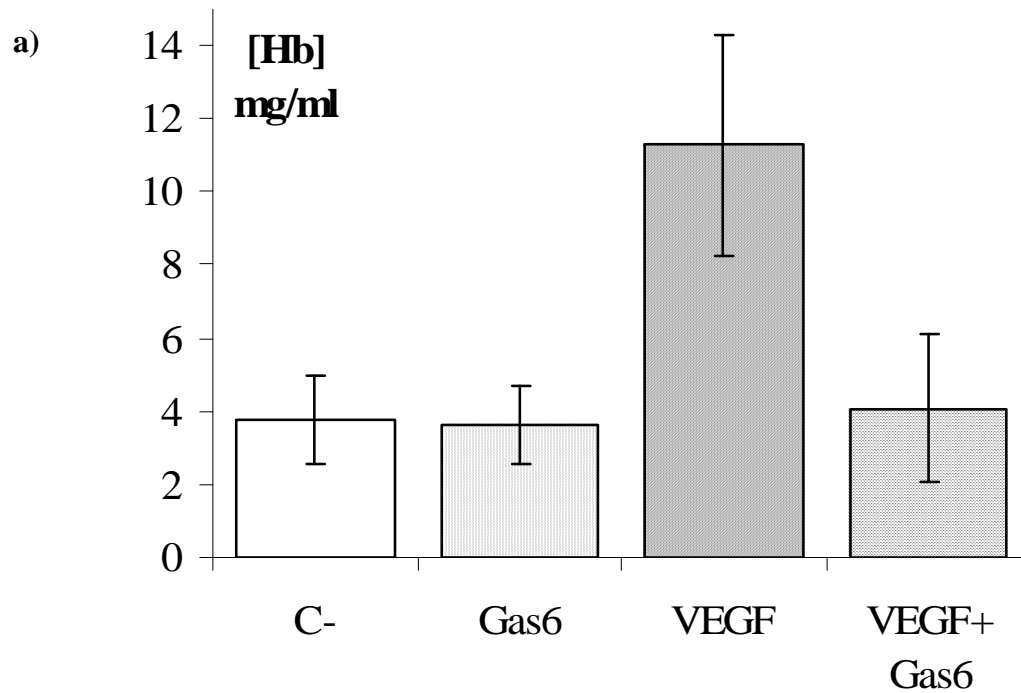


Fig.2 Effetto di Gas6 su angiogenesi VEGF dipendente. Dosaggio Hb.

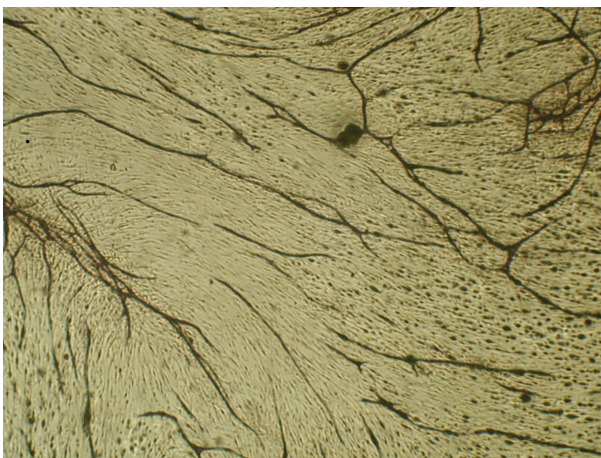
a) confronto delle concentrazioni medie e ripetitive deviazioni standard tra i gruppi. b) confronto delle medie delle variazioni percentuali della concentrazione di emoglobina rispetto al controllo negativo (100%) nei plugs e delle rispettive deviazioni standard tra i gruppi.

Gas6 inibisce l'angiogenesi VEGF dipendente in un modello complesso di angiogenesi umana "in vitro"

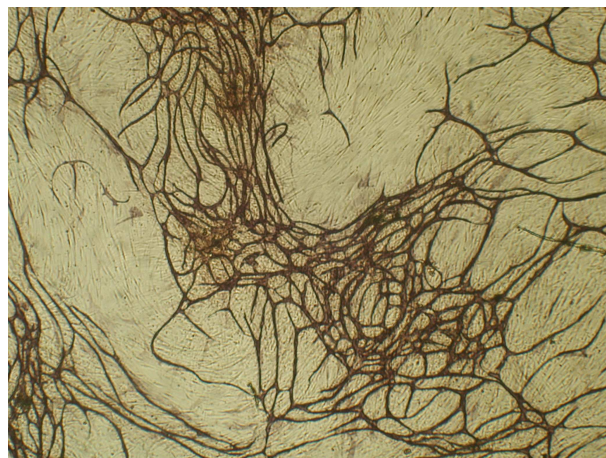
Abbiamo studiato l'effetto della proteina Gas6 sull'angiogenesi VEGF-dipendente in un modello umano *in vitro*, in cui le cellule endoteliali umane sono coltivate con fibroblasti umani e vengono stimulate aggiungendo al medium di coltura attivatori ed inibitori della angiogenesi. Sono stati condotti n°3 esperimenti replicati con n°3 casi in replicato per ciascun esperimento. E' stato valutato l'effetto di rhGas6 200 ng/ml nell'inibizione della neoangiogenesi indotta da rhVEGF (2 ng/ml).

Come si può notare nella figura 3, dopo colorazione immunohistochimica con anticorpi anti-CD-31, nei pozzetti di controllo sono presenti piccole isole di cellule endoteliali sparse nella matrice, che tendono spontaneamente ad organizzarsi in strutture tubulari lineari ma non formano aggregati (**a**). Nei pozzetti in cui al terreno è stato aggiunto il VEGF, rispetto al controllo, si osservano strutture lineari vascolari in formazioni più evidenti e con maggiore densità; sono presenti, inoltre, numerosi foci di aggregazione di strutture tubulari (**b**). In presenza di Gas6 200 ng/ml si osserva una inibizione del processo angiogenetico VEGF dipendente (**c**), con raggruppamenti tubulari organizzati e con densità dei tubuli neoformati inferiore rispetto a quanto osservato per il VEGF; quadro simile al controllo non trattato o alla combinazione VEGF e suramina (**d**).

a)



b)



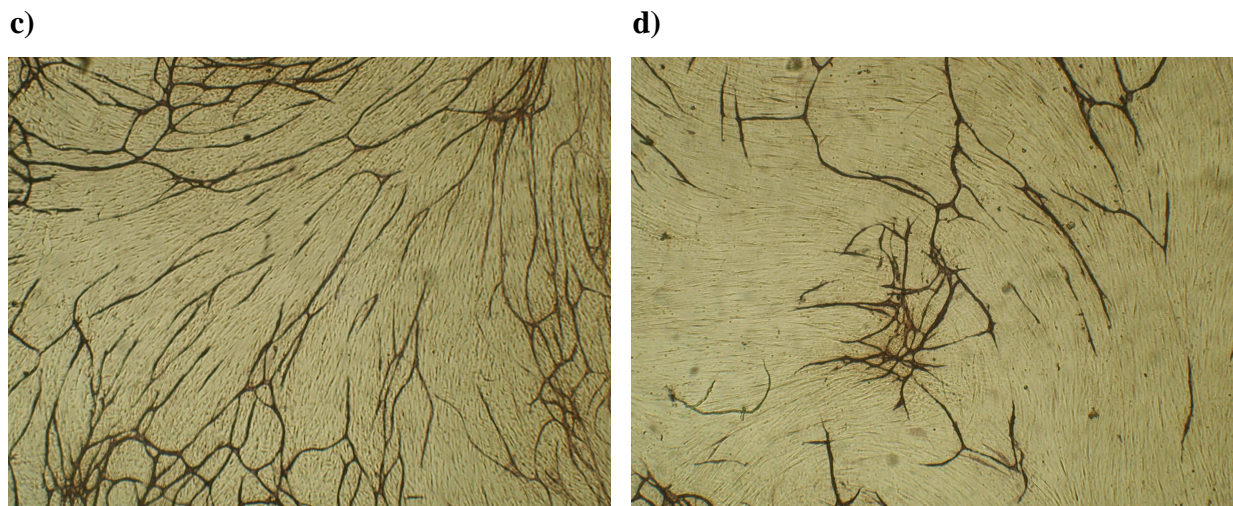


Figura 3. Immagini in microscopia ottica 5x dopo colorazione immunostochimica. a) controllo negativo, b) VEGF, c) VEGF + Gas6, d) VEGF + suramina

Questi risultati sono stati confermati dal test ELISA con anticorpo anti CD-31 che quantifica la “concentrazione di neovasi”; le assorbanze sono state normalizzate in variazione percentuale rispetto alla media del controllo negativo di ogni esperimento. Viene riportata la media delle variazioni percentuali delle assorbanze per ciascun gruppo sperimentale insieme con la rispettiva deviazione standard (**Tabella 1 e Figura 4**).

<i>Caso</i>	<i>N°casi</i>	<i>Variazione % rispetto a C- ± DS</i>
Controllo non trattato	9	100 ± 12
VEGF	9	181 ± 32
Rh-Gas6	9	102 ± 13
VEGF + rh-Gas6	9	125 ± 29
Suramina	9	67 ± 22
VEGF + Suramina	9	122 ± 18

Tabella 1. Media delle assorbanze dei pozzetti dell’angiokit.

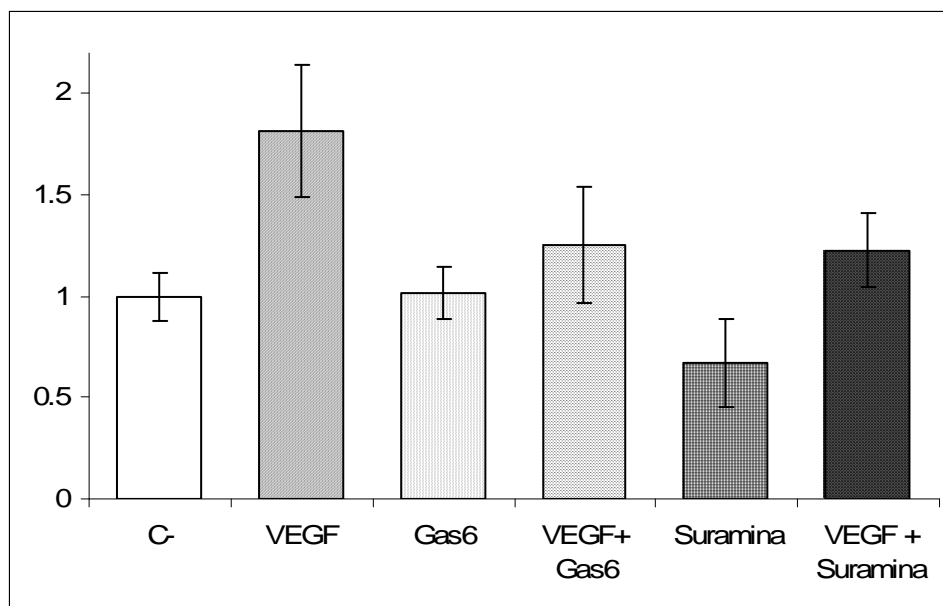


Figura 4. *Variazione percentuale delle assorbanze dei casi VEGF, rhGas6 e VEGF + rhGas6 rispetto al controllo non trattato.*

L'analisi della varianza della media della variazione % delle assorbanze è risultata statisticamente significativa tra i gruppi ($p < 0.0001$). Nell'analisi post-hoc sono risultati statisticamente significativi i confronti tra VEGF e tutti gli altri casi ($p < 0.0002$) pertanto la concentrazione di CD-31 indice della vascolarizzazione è stata statisticamente inferiore nel gruppo VEGF + Gas6 rispetto al solo VEGF. Inoltre tutti gli altri confronti tra i gruppi sono risultati non significativi, fatta eccezione per una tendenza a valori di densità vascolare inferiori rispetto a tutti gli altri gruppi in presenza di sola suramina ($p = 0.055$), in pratica la presenza di Gas6 annulla l'incremento della crescita vasale indotta dal VEGF ma non inibisce la organizzazione vascolare VEGF indipendente, come capita per la suramina. Tali risultati testimoniano la specificità dell'effetto anti-VEGF della proteina Gas6.

Gas6 inibisce l'angiogenesi tumorale VEGF dipendente in un modello complesso di angiogenesi umana "in vitro" indotta dalla linea DU145 (carcinoma metastatizzante di prostata)

Per valutare invece se Gas6 potesse essere efficace nel limitare la neoangiogenesi tumorale di cellule esprimenti spontaneamente VEGF, abbiamo impiegato surnatanti raccolti da colture di cellule MDA-MB-231 e DU145. In pratica abbiamo impiegato il surnatante di tali linee cellulari come induttore della angiogenesi nel modello in vitro dell'angiokit e abbiamo valutato l'effetto di Gas6 nel controllare tale processo.

Mediante un kit ELISA per il dosaggio del VEGF umano abbiamo misurato la concentrazione del VEGF nei surnatanti raccolti dalle linee DU145 e MDA-MB-231 (6 campioni per ciascuna linea cellulare). I surnatanti della linea cellulare DU145 presentavano valori elevati di VEGF con una concentrazione massima di 30 ng/ml. Nettamente inferiore è risultata la produzione di VEGF da parte della linea MDA-MB-231 per cui si è ottenuta una concentrazione massima di VEGF di 8 ng/ml. Dopo esperimenti preliminari, abbiamo quindi impiegato il surnatante di ambedue le linee alla diluizione di 1:4 per la linea DU145 e 1:2 per la linea MDA-MB-231.

Abbiamo quindi eseguito n°3 esperimenti con n°3 casi in replicato per ogni variabile sperimentale. Non è stato possibile indurre una risposta angiogenica significativa utilizzando il surnatante delle cellule MDA-MB-231 che pertanto non sarà di seguito considerato, mentre è stata ottenuta una buona risposta angiogenica, seppur inferiore al VEGF 2ng/ml, utilizzando il surnatante delle cellule DU 145. Gas6 alla concentrazione di 200 ng/ml è risultato efficace nell'inibire tale effetto (**Tabella 2 e Figura 5**).

Anche in questo caso sono state confrontate le medie della variazione percentuale delle assorbanze del test ELISA con anticorpo primario anti CD31 rispetto al controllo non trattato. In presenza del surnatante delle cellule DU145 abbiamo ottenuto una neovascolarizzazione maggiore rispetto al controllo negativo (post hoc, $p < 0.05$) ma aggiungendo Gas6 200 ng/ml a tale surnatante tale effetto viene inibito (surnatante DU145 vs surnatante DU145+Gas6, post hoc, $p < 0.05$).

<i>Caso</i>	<i>N°casi</i>	<i>Variatione rispetto a C- ± DS</i>
Controllo non trattato	9	1.00 ± 0.12
VEGF	9	1.81 ± 0.32
Rh-Gas6	9	1.02 ± 0.13
VEGF + rh-Gas6	9	1.25 ± 0.29
DU145	9	1.57 ± 0.16
DU145 + Gas6	9	1.06 ± 0.08

Tabella 2. *Media delle assorbanze dei pozzetti dell'angiokit.*

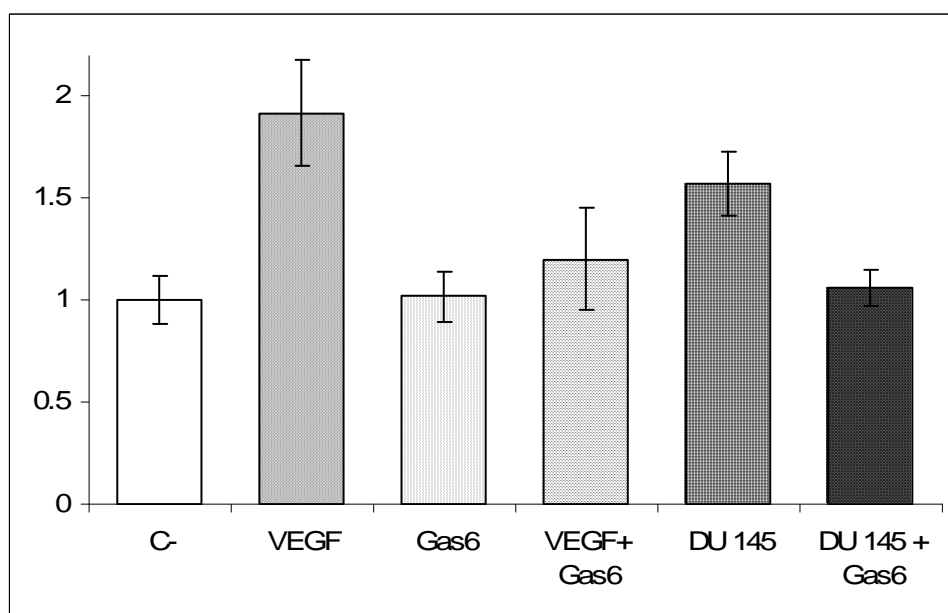


Figura 5. *Variatione percentuale delle assorbanze dei casi VEGF, rhGas6, surnatante DU145 e surnatante DU145+Gas6 rispetto al controllo non trattato.*

Valutazione dell'effetto di Gas6 riguardo alla neoangiogenesi tumorale VEGF dipendente "in vivo".

Abbiamo quindi valutato "in vivo" l'effetto di Gas6 nell'inibire la neovascolarizzazione indotta da linee cellulari tumorali con spontanea produzione di VEGF. Abbiamo infatti indotto angiogenesi utilizzando il surnatante della linea cellulare tumorale murina B16F0 (melanoma) singenica con in topi C57BL/6NCr1BR nel modello di matrigel plug, descritta in letteratura (Ishikawa M et al., 2007) overprodurre VEGF. Abbiamo quantificato l'angiogenesi mediante il dosaggio dell'Hb nel plug di matrigel.

Abbiamo eseguito 1 esperimento preliminare con casi in quintuplicato e 2 esperimenti consecutivi con ciascun caso condotto in quadruplicato. Abbiamo osservato che il surnatante raccolto dalle cellule B16F0 utilizzato ad una diluizione 1:5 ha comportato un buon effetto angiogenetico (incremento in media della concentrazione di Hb nei plug di matrigel del 208% rispetto al controllo negativo).

Abbiamo quindi confermato l'efficacia della proteina Gas6 nell'inibire l'angiogenesi neoplastica indotta mediante il surnatante delle cellule B16F0 già riscontrata in un esperimento pleliminare. La concentrazione media di Hb è risultata essere di 3.8 ± 1.2 mg/ml per il controllo negativo solo matrigel e 3.6 ± 1.0 per il controllo negativo matrigel + Gas6. In presenza del surnatante della linea B16F0 la concentrazione di Hb è risultata di 7.9 ± 1.7 mentre se al surnatante veniva aggiunto rmGas6 500 ng/ml di 4.6 ± 1.7 (**Figura 6a, 6b**). Pertanto Gas6 ha determinato una riduzione del $44 \pm 21\%$ della concentrazione di emoglobina nei plug di matrigel. Tale riduzione è risultata statisticamente significativa (Test post hoc di Tukey, surnatante B16F0 vs tutti i gruppi $p < 0.002$). Gli altri confronti non sono risultati statisticamente significativi.

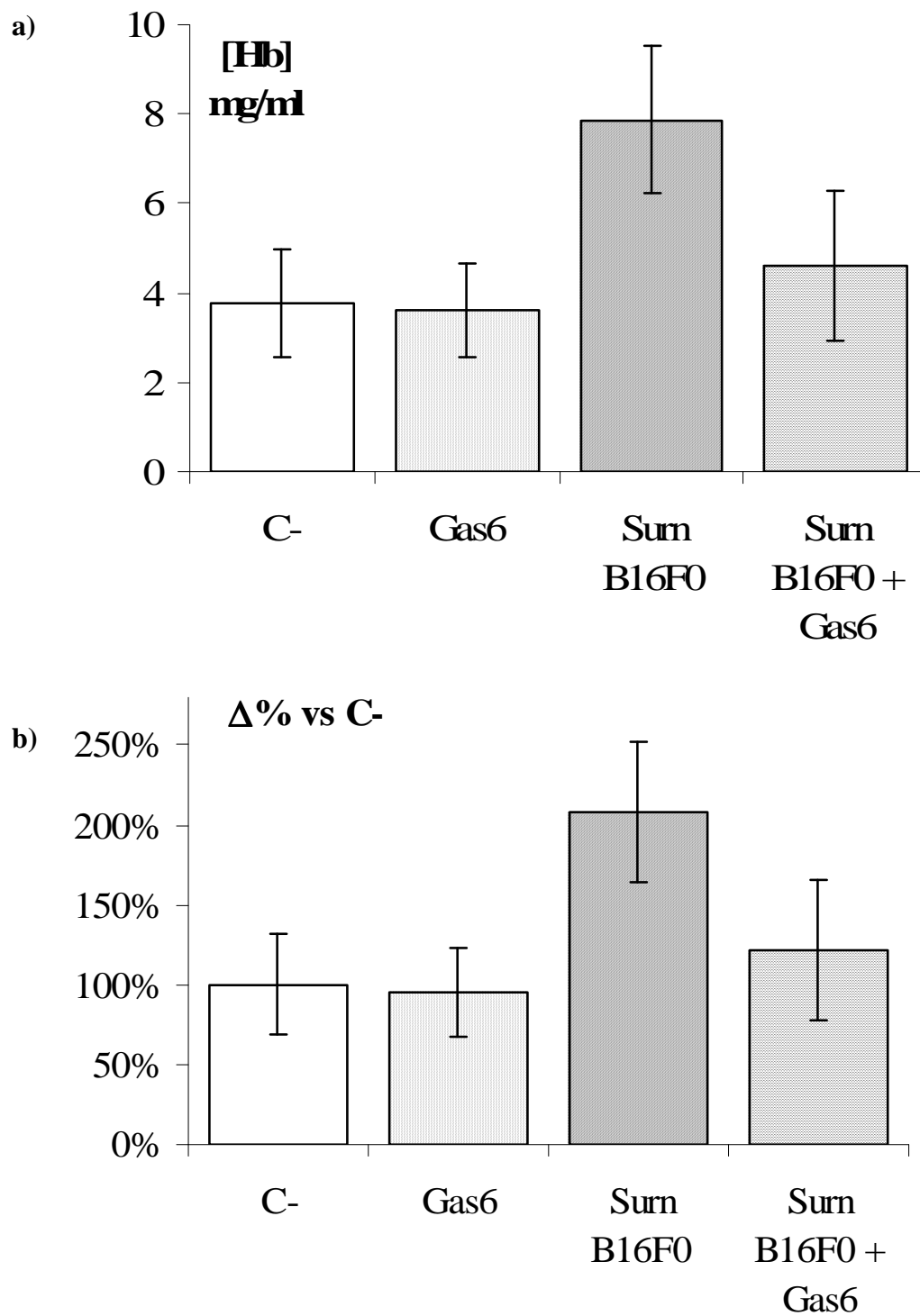


Fig.6 Effetto di Gas6 su angiogenesi tumorale VEGF dipendente. Dosaggio Hb.

a) confronto delle concentrazioni medie e ripetitive deviazioni standard tra i gruppi. b) confronto delle medie delle variazioni percentuali della concentrazione di emoglobina rispetto al controllo negativo nei plugs e delle rispettive deviazioni standard tra i gruppi.

Valutazione dell'effetto di Gas6 riguardo alla neoangiogenesi tumorale VEGF dipendente "in vivo" indotta dall'impianto di cellule neoplastiche.

E' stato avviato la valutazione preliminare dell'effetto di Gas6 sull'angiogenesi tumorale indotta da cellule neoplastiche all'interno del matrigel negli animali da esperimento. Sulla base degli esperimenti sopra descritti abbiamo impiegato linea cellulare tumorale murina non metastatizzante B16F0 (melanoma) singenica con in topi C57BL/6NCrlBR n, descritta in letteratura overprodurre VEGF (Ishikawa M et al., 2007).

Sono stati eseguiti alcuni esperimenti preliminari per titolare le seguenti variabili: il numero minimo necessario di cellule tumorali per creare una rete vascolare quantificabile, il numero massimo di tali cellule per evitare la sostituzione del matrigel da parte di tessuto tumorale e il tempo di permanenza delle masse inoculate.

Abbiamo verificato che 350 cellule diluite in un volume di 500 µl di matrigel mantenute per 2 settimane nel topo producono una crescita tumorale in numerosi macroaggregati all'interno della matrice con una neovascolarizzazione misurabile abbastanza costante con incremento della neovascolarizzazione di circa il 400% rispetto al controllo non trattato senza sostituzione del matrigel o infiltrazione dei tessuti esterni.

Sono in corso di esecuzione esperimenti replicati per valutare l'effetto della proteina Gas6 alla concentrazione di 500 ng/ml e a concentrazioni inferiori sulla neovascolarizzazione determinata dalle cellule direttamente inoculate insieme al matrigel nell'animale da esperimento. Non sono ancora disponibili risultati preliminari.

Procedure sperimentali al momento in corso.

Abbiamo eseguito il clonaggio del gene mGas6 in un vettore di espressione pcDNA3.1(+) con gene di resistenza alla geneticina per selezione nelle cellule eucariote (ampicillina nei batteri) come descritto nella sezione “metodi”.

Verrà eseguita una procedura di trasfezione liposomiale utilizzando la soluzione DOTAP (Roche, svizzera), attualmente tale procedura è in corso.

Una volta ottenuti cloni della linea cellulare B16F0 transfettati ad overesprimere mGas6 tali cellule verranno confrontate con le cellule B16F0 originali (wild type) e con quelle transfettate con il gene vuoto (mock) per verificare l'effetto di Gas6 nel controllare lo sviluppo angiogenetico.

DISCUSSIONE

Lo stretto legame tra la progressione della malattia neoplastica ed il processo angiogenetico è stato ipotizzato da Folkman più di trenta anni fa. Questo ha portato a considerare la terapia antiangiogenica come elemento importante nel trattamento di molte neoplasie. La terapia antiangiogenetica colpisce in maniera selettiva le cellule endoteliali in proliferazione tumultuosa come nel caso dell'angiogenesi patologica senza interferire con i normali e fisiologici processi angiogenetici (Zhi H e Shi-Deng B, 2004).

L'inibizione dell'angiogenesi tumorale mediante l'inibizione dell'attività di VEGF rappresenta un approccio terapeutico razionale. VEGF, infatti, è il fattore chiave nell'induzione dell'angiogenesi ed è iperespresso in un gran numero di tumori umani (Liekens S et al, 2001).

Il rilascio di VEGF da parte delle cellule tumorali scatena l'attivazione del processo angiogenetico, che connette il tumore alla rete vascolare dell'ospite, consentendo alle cellule tumorali di ricevere l'apporto ematico e nutritivo necessario per la proliferazione e facilitandone la diffusione metastatica (Malonne H, Langer I, 1999). L'iperpressione di VEGF, inoltre, conferisce al tumore resistenza al trattamento citotossico, sia chemio che radioterapico: la struttura vascolare indotta dal VEGF è caratterizzata da un'elevata permeabilità, che determina aumento della pressione interstiziale e intratumorale, ostacolando così un'adeguata diffusione degli agenti chemioterapici e creando aree di relativa ipossia non responsive al trattamento radiante (Folkman J, 1995).

Un recente lavoro ha dimostrato che la proteina Gas6 ha una funzione inibitoria sul processo angiogenetico indotto dal VEGF in vitro e nel saggio "in vivo" della membrana coriontalloidea di pollo (Gallicchio M et al, 2005). Questo effetto si esplicherebbe tramite la defosforilazione del recettore VEGFR2.

Sulla base di tali risultati, abbiamo messo a punto ed iniziato ad impiegare un modello animale murino per confermare l'effetto della proteina Gas6 come inibitore dell'angiogenesi indotta da VEGF e per valutare un potenziale effetto inibitorio sull'angiogenesi tumorale VEGF dipendente.

Sulla base dei risultati ottenuti nel modello "matrigel plug" sia con valutazione morfologica quantificata con un apposito score istologico sia mediante il dosaggio dell'Hb nei plug di matrigel abbiamo confermato che Gas6 effettivamente inibisce l'angiogenesi tumorale VEGF dipendente "in vivo". Tale risultato quindi conferma i dati "in vitro" e quelli ottenuti nel saggio "in vivo" sulla membrana corion-allantoidea di pollo. I risultati ottenuti che

evidenziano un'effetto inibitorio sull'angiogenesi VEGF dipendente della proteina Gas6 non sono la semplice conferma di quanto già dimostrato in precedenza (Gallicchio et al., 2005) in quanto il modello plug di matrigel rappresenta una simulazione prossima al reale degli eventi patologici neoangiogenetici. Infatti in tale modello viene indotta l'invasione di una rete vascolare di un tessuto fibro-connettivale preesistente. Tale fatto permette di simulare le interazioni tra endotelio, matrice extracellulare e tessuto di supporto che avvengono nell'effettivo processo di neovascolarizzazione di un tessuto tumorale in crescita che non possono essere valutate nel saggio della membrana corion-allantoidea di pollo. In quest'ultimo infatti il ruolo proangiogenetico di VEGF è facilitato dalla più semplice diffusibilità delle sostanze, dall'assenza di resistenze fisiche alla migrazione delle cellule endoteliali e dalla minima presenza di matrice extracellulare. Tale saggio, pertanto, se è utile a confermare l'effetto antiangiogenetico VEGF dipendente di una sostanza non è invece adeguato a simulare le complesse interazioni tissutali che avvengono nella neovascolarizzazione di un tessuto solido.

Pertanto riteniamo che questi risultati siano l'effettiva conferma che Gas6 è un importante attore nel controllo del processo angiogenetico VEGF dipendente.

Allo scopo inoltre di confermare la validità di tali risultati abbiamo utilizzato un modello di angiogenesi umana "in vitro" di una cocoltura di cellule endoteliali e fibroblasti che permette di valutare morfologicamente e quantitativamente la crescita e l'organizzazione vasale VEGF dipendente. Anche in questo modello Gas6 alla concentrazione di 200 ng/ml è risultato efficace nell'inibire l'angiogenesi VEGF dipendente ma non la crescita e l'organizzazione spontanea delle cellule endoteliali con abbozzo di tubuli disorganizzati che avviene in assenza di VEGF per l'interazione con la matrice extracellulare e con i fibroblasti. Ciò è testimoniato dal fatto che Gas6 determina un'inibizione dell'angiogenesi in presenza di VEGF ma non in sua assenza come invece avviene per la suramina che risulta inibire anche l'angiogenesi non VEGF dipendente. Inoltre tali risultati sono stati ottenuti in un modello complesso di angiogenesi con cellule umane superiore al modello di crescita e organizzazione morfologica delle cellule endoteliale nel matrigel (Gallicchio et al., 2005) in quanto simula la formazione di abbozzi vascolari dominando cellule endoteliale con cellule di supporto della parete vasale. Riteniamo pertanto di concludere che Gas6 rappresenta un inibitore specifico della angiogenesi VEGF dipendente in un modello umano complesso "in vitro" e in un altrettanto complesso modello animale molto prossimo al contesto in cui gli eventi fisiologici e patologici dell'angiogenesi si verificano.

Quindi abbiamo valutato l'effetto di gas6 nel ridurre l'angiogenesi indotta da neoplasie solide note produrre VEGF. Anche in questo caso abbiamo ottenuto risultati sia nel modello "in vitro" umano, sia "in vivo" nel topo. Infatti nel modello "in vitro" Gas6 è risultato inibire la neoangiogenesi indotta dal surnatante della linea cellulare metastatizzante di prostata DU145 così come "in vivo" quella indotta dal surnatante della linea B16F0.

Tali risultati sono la prima dimostrazione dell'effetto di Gas6 nel controllo dell'angiogenesi patologica VEGF dipendente. A tale riguardo si possono formulare alcune considerazioni. Gas6 è una proteina fisiologica circolante nel plasma umano ad una concentrazione di circa 20 ng/ml (Alciato F et al., 2008) ma la fonte di tale produzione non è del tutto nota, infatti cellule del sistema immunitario (monociti) (Lemke e Lu, 2003) così come le cellule endoteliale ne esprimono RNA messaggero e trascritto proteico (Avanzi G et al., 1998). E' verosimile ipotizzare quindi che gas6 possa essere un inibitore fisiologico della neoangiogenesi con la funzione di favorire la stabilizzazione dell'endotelio dei vasi maturi sfavorendo la crescita di nuovi vasi. E' verosimile attendersi inoltre che in condizioni patologiche tale equilibrio viene a essere turbato con l'eccesso di produzione di fattori proangiogenetici che quindi superano tale effetto inibitorio, così come in letteratura è stato dimostrato per altri inibitori fisiologici dell'angiogenesi (Risau W, 1997). Inoltre va considerato che abbiamo ottenuto un effetto significativo di Gas6 nell'inibire l'angiogenesi patologica sia in vivo sia in vitro con concentrazioni nettamente superiori a quelle plasmatiche (200 ng/ml) e con minore effetto a concentrazioni inferiori. Di conseguenza in mancanza di un'incremento di trascrizione di Gas6 la overproduzione di fattori proangiogenetici ed in particolare di VEGF in condizioni patologiche ne supera l'effetto inibitorio. Possiamo quindi ipotizzare una possibile applicazione della proteina Gas6 somministrata a dosi "farmacologiche" per sopperire alla overproduzione di VEGF in condizioni patologiche come per esempio nel caso di neoplasie solide esprimenti VEGF o nel caso di neoangiogenesi in altri processi patologici come per esempio la retinopatia diabetica o tutti i processi infiammatori cronici con la formazione di tessuto infiammatorio (ad. es il panno infiammatorio dell'artrite reumatoide). gas6 quindi potrebbe essere un potenziale strumento terapeutico per controllare l'angiogenesi patologica VEGF dipendente.

Per verificare tale ipotesi sono in corso esperimenti per valutare se Gas6 sia in grado di controllare la crescita vascolare tumorale indotta direttamente dall'impianto di cellule tumorali "in vivo" sia utilizzando cellule impiantate nel matrigel plug in presenza/assenza di Gas6 sia attraverso la produzione di linee cellulari tumorali ricombinanti esprimenti Gas6 da confrontare con le wild type.

Sviluppi del progetto:

- Valutazione dell'inibizione da parte di Gas6 dell'angiogenesi indotta inoculando le cellule B16F0 nel plug di matrigel.
- Valutazione dell'angiogenesi indotta inoculando cellule B16F0 wild type e trasfettate con Gas6 nel plug di matrigel.
- Studio della possibilità di somministrazione intraperitoneale di Gas6 nel topo e valutazione delle misure di farmacocinetica per ottenere concentrazione plasmatiche di Gas6 di 200-500 ng/ml e valutazione di eventuali complicanze di tale trattamento.
- Valutazione dell'inibizione dell'angiogenesi nel plug di matrigel (VEGF, surnatante B16F0, cellule B16F0 wt) somministrando Gas6 intraperitoneale.
- Valutazione dell'effetto di Gas6 nel controllo della neoangiogenesi patologica VEGF indotta non tumorale.

BIBLIOGRAFIA

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. GAS6 inhibits granulocyte adhesion to endothelial cells. *Blood* 1998; 91:2334-40

Avanzi GC, Gallicchio M, Cavalloni G, Gammaitoni L, Leone F, Rosina A, Boldorini R, Monga G, Pegoraro L, Varnum B, Aglietta M. Gas6, the ligand of Axl and Rse receptors, is expressed in hematopoietic tissue but lacks mitogenic activity. *Exp Hematol* 1997; 25:1219-26

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6:389-95.

Chen J, Carey K, Godowsky PJ. Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* 1997; 14:2033-9

Collett G, Wood A, Alexander MY, Varnum BC, Boot-Handford RP, Ohanian V, Ohanian J, Fridell YW, Canfield AE. Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. *Circ Res* 2003; 92:1123-9

Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest.* 1999 Jan;103(2):157-8.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-76

Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333:1757-63

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376:66-70

Gallicchio M, Mitola S, Valdembri D, Fantozzi D, Varnum B, Avanzi GC, Bussolino F. Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 - mediated endothelial cell activation by Axl Tyrosine Kinase Receptor1. *Blood* 2005; 105:1970-6

Godowsky PJ, Mark MR, Chen J, Sadick MD, Raab H, Hammonds RG. Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro3. *Cell* 1995; 82:355-8

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86:353-64.

Ishikawa M, Kawase I, Ishii F. Combination of amino acids reduces pigmentation in B16F0 melanoma cells. *Biol Pharm Bull*. 2007; 30:677-81.

Joseph DR. Sequence and functional relationships between androgen-binding protein/sex hormone binding globulin and its homologs protein S, Gas6, laminin, and agrin. *Steroids* 1997; 62:578-88

Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001; 61:253-70

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. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* 1999; 398:723-8.

Lemke G, Lu Q. Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 31-36.

Malonne H, Langer I. Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. *Clinical Experimental Metastasis* 1999; 17:1-14

Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. 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; 13:4976-85

Manzow S, Brancolini C, Marks F, Richter KH. Expression of growth arrest-specific (Gas) genes in murine keratinocytes: Gas2 is specifically regulated. *Exp Cell Res* 1996; 224:200-3

Masabumi S. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Sci* 2003; 94:751-6

Melaragno MG, Wuthrich DA, Poppa V, Gill D, Lindner V, Berk BC, Corson MA. Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats. *Circ Res* 1998; 83:697-704

Nakano T, Higashino K, Kikuchi N, Kishino J, Nomura K, Fujita H, Ohara O, Arita H. Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors. *J Biol Chem* 1995; 270:5702-5

Neubauer A, Fiebeler A, Graham DK, O'Bryan JP, Schmidt CA, Barckow P, Serke S, Siegert W, Snodgrass HR, Huhn D. Expression of Axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 1994; 84:1931-41

O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET. Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukaemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1991; 11:5016-31

O'Donnell K, Harkes IC, Dougherty L, Wicks IP. Expression of receptor tyrosine kinase Axl and its ligand Gas6 in rheumatoid arthritis: evidence for a novel endothelial cell survival pathway. *Am J Pathol* 1999; 154:1171-80

Prieto AL, Weber JL, Tracy S, Heeb MJ, Lai C. Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system. *Brain Res* 1999; 816:646-61

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671–4

Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 1988; 54:787-93

Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Path* 2004; 85:233-48

Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* 1995; 80:661-70

Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev* 2003; 24:600-32

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

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991 Jan 3;324(1):1-8.

Zhi H, Shi-Deng B. Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10:463-70

SEZIONE 2:

ATTIVITA'FORMATIVA

CORSI FREQUENTATI

- Corso di inglese, Prof. Irving-Bell
- Corso di statistica, Prof. Magnani

SEMINARI I anno

- “Stem cells in cardiac pathophysiology and treatment”, Dott. Paolo Di Nardo
- “Creazione di *antigen protein microarray* a fini di ricerca e diagnostica”, Dott. Paola Secco
- “Patogenesi molecolare dei linfomi associati ad immunodeficienza”, Dott. Daniela Capello
- “Modulazione funzionale del canale cardiaco Kv4.3 da parte di subunità accessorie”, Dott. Diego Cotella
- “Studio di fattori genetici coinvolti nella suscettibilità alla Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)”, Dott. Lucia Corrado
- “Gene silencing by RNA interference (RNAi)”, Prof . Paola Defilippi
- “Detection of miRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3'-UTR regions”, Prof. Michele Caselle
- “The long hand of the small RNAs reaches into several levels of gene regulation”, Prof . Carlo Cogoni
- “Human Cytomegalovirus (HCMV) from clinic to the bench and return”, Prof . Thomas Mertens
- “La valutazione del controllo nervoso della circolazione in clinica: dalla teoria alle applicazioni pratiche”, Prof . Massimo Pagani
- “Fragile X syndrome from RNA metabolism impairment to spine dysmorphogenesis”, Prof . Claudia Bagni
- “Relazioni tra struttura e funzione delle proteine mediante analisi del protein data base”, Dott. Marco Milanese

- “Difetti genetici del pre-B cell receptor ”, Dott. Simona Ferrari
- “The regulation of hematopoietic stem cells by SMAD signaling”, Prof. Stefan Karlsson
- “Translating basic science into therapeutic strategies for shwachman diamond syndrome”, Prof. Steven R. Ellis
- “Sindromi autoinfiammatorie”, Dott. Alberto Martini
- “Bioinformatic tools for the analysis of UTRs and for the prediction of alternative spliced transcripts”, Dott. Flavio Mignone

Seminari II anno.

- “Meccanismi molecolari di fibrogenesi nella steatoepatite non alcolica”. Prof. Fabio Marra
- “Human papillomavirus loads and its correlation with non-melanoma skin cancer”, Dott. Soenke Weissenborn
- “Biologia molecolare e genetica in ambito forense: principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche” Tenente Dott. Giorgio Portera
- “K⁺ channels in the heart: in and out of control”, Dr Susanne Radicke Ph.D
- “Integrin trafficking and tumour cell invasiveness”, Dr Jim Norman
- “La microscopia a forza atomica nella ricerca biomedical: dalle immagini alle interazioni”, Prof. Mario Raspanti
- “La proteina HMGB1 è un segnale di danno tissutale”, Prof M. E. Bianchi
- “Analytic vaccinology and HCMV: human monoclonal antibodies as tool to identify novel antigens for protective vaccination”, dott Annalisa Macagno Ph.D
- “Fatty liver preservation against ischemia-reperfusion injury”, dott.Joan Rossello Catafau
- “Mutazioni del gene neonatale dell’insulina come causa di diabete neonatale/infantile: un nuovo esempio di malattia da misfolding”, Prof. Fabrizio Barbetti
- “Interazioni tra tumore e sistema immunitario nella leucemia linfatica cronica: il ruolo della via metabolica del mevalonato”, dott Massimo Massaia
- “Ghrelin e pancreas endocrino”, Prof. Riccarda Granata
- “The mechanism of cell infection with Hepatitis C virus – novel potential targets for therapeutic interventions”, Prof. Agata Budkowska
- “Ruolo dei papillomavirus umani nello sviluppo dei tumori del distretto genitale”, Prof. Santo Landolfo

- “Dinamica dell’infezione da HPV ed epidemiologia del cancro alla cervice uterina: implicazione per le strategie di vaccinazione”, Dott. Jacopo Bussano
- “La ricerca farmacologica: dal laboratorio alla clinica”, Dott. Domenico Valle
- “Sistema degli endocannabinoidi: nuovo target terapeutico per l’obesità e le sue complicanze cardio-metaboliche”, Prof. Uberto Pagotto

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

- Corso inquadramento diagnostico e impostazione terapeutica delle artropatie psoriasiche, Milano, 17 Novembre 2006
- Aspetti ematologici della Malattia di Gaucher, Verona, 29 giugno 2007.
- Annual European Congress of Rheumatology (EULAR), Barcelona, June 13-16, 2007
- 11th Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS), Brussels, August 25-28, 2007.
- 17th European Respiratory Society (ERS) Annual Congress, Stockholm, September 15-19, 2007.
- First International Conference Advances in Clinical Neuroimmunology, Poznan, 7-8 December 2007
- XI Congresso Nazionale del Collegio Reumatologi Ospedalieri Italiani (CROI), Situazioni difficili in reumatologia clinica, Bologna 2-5 aprile 2008
- Interactive experience on spondyloarthritis, Matera, 8-9 Maggio 2008.
- Le patologie reumatiche, La remissione: un obiettivo oggi raggiungibile, Roma 29-30 Maggio 2008.
- Investigator’s meeting Protocollo Studio ML21774 “RUBINO: Observational Prospective Study to evaluate Rituximab safety In TNF failures RA population”, Roma 27 giugno 2008.
- 12th Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS), Madrid, 23-26 August, 2008.
- 6th International Congress on Autoimmunity, Porto, September 10-14, 2008

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

A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

Sainaghi PP, Collimedaglia L, Alciato F, Leone MA, Puta E, Naldi P, Castello L, Monaco F, Avanzi GC. Elevation of Gas6 protein concentration in cerebrospinal fluid of patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *Eur J Neurol* 2007; 14 Suppl I: 126 (Abstract to the 11th Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS), Brussels, August 25-28, 2007.)

Sainaghi PP, Alciato F, Carnieletto S, Massarotti M, Sola D, Castello L, Inglese E, Bellomo G, Avanzi GC. Measurement of Gas6 protein in patient with acute dispnea. *Eur Respir J* 2007; 30 Suppl 51: 51 (Abstract to the 17th European Respiratory Society (ERS) Annual Congress, Stockholm, September 15-19, 2007).

Sainaghi PP, Collimedaglia L, Alciato F, Leone MA, Naldi P, Monaco F, Avanzi GC. Cerebrospinal fluid (CSF) cytokines, chemokines and growth factors in Guillain Barre' syndrome (GBS) versus Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy (CIDP). Abstract to the 6th International Congress on Autoimmunity, Porto, September 10-14, 2008

B) Altre comunicazioni

Sainaghi PP, 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 (Abstract to the Annual European Congress of Rheumatology (EULAR), Barcelona, June 13-16, 2007)

Marconi C, Minisini R, **Sainaghi P**, Fabris L, Franzosi L, Mossio E, Alciato F, Toniutto P, Smirne C, Avanzi G, Pirisi M. Gas6 is produced by human stellate cells and its plasma levels reflect the severità of cirrhosis. *Dig Liv Dis.* 2008 Feb. Vol 40:A8 AISF, Roma, 20-22 Febbraio 2008

Marconi C, Minisini R, **Sainaghi PP**, Franzosi L, Alciato F, Fabris C, Toniutto P, Avanzi GC, Pirisi M. Gas6 is constitutively produced by human stellate cells and its plasma concentration reflects cirrhosis progression. J Hepatol. 2008 Apr Suppl 2 Vol 48, EASL, Milano, 23-27 Aprile 2008.

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO (elenco completo)

Sainaghi PP, Collimedaglia L, Alciato F, Leone MA, Puta E, Naldi P, Castello L, Monaco F, Avanzi GC. Elevation of Gas6 protein concentration in cerebrospinal fluid of patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *J Neurol Sci.* 2008 Jun 15;269(1-2):138-42.

Bergamasco L, **Sainaghi PP**, Castello L, Letizia C, Bartoli E. In vitro effect of cyclosporine-A on angiotensins secretion by glomerular cells. *Nephrology (Carlton).* 2008 Jun;13(4):302-8.

Alciato F, **Sainaghi PP**, Castello L, Bergamasco L, Carnieletto S, Avanzi GC. Development and validation of an ELISA method for detection of growth arrest specific 6 (Gas6) protein in human plasma. *J Immunoassay Immunochem.* 2008;29(2):167-80.

Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Carnevale Schianca GP, Bartoli E. Metabolic characteristics of glucose intolerance: the critical role of obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2008 Feb;116(2):86-93.

Bartoli E, Bergamasco L, **Sainaghi PP**, Guidetti F, Castello L. An improved method to compute the solute and water derangements of hyperglycaemia. *Eur J Appl Physiol.* 2007. Dec;102(1):97-105.

Bartoli E, Castello L, Bergamasco L, **Sainaghi PP**. A new method to distinguish the hyponatremia of electrolyte loss from that due to pure solvent changes. *Eur J Appl Physiol.* 2007 Sep;101(1):133-42.

Sainaghi PP, Castello L, Limoncini AM, Bergamasco L, Bartoli E, Schianca GP. Poor specificity of fasting plasma glucose cut-off values in ruling out glucose intolerance: the complementary usefulness of OGTT. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007 Feb;115(2):112-7.

Pubblicazioni inviate per pubblicazione (attualmente in revisione).

Sainaghi PP, Alciato F, Carnieletto S, Castello L, Bergamasco L, Sola D, Bongo AS, Inglese E, Polosa R, Avanzi GC. Gas6 evaluation in patients with acute dyspnea due to suspected pulmonary embolism. *Respiratory Medicine* (accettato con revisione)

Pubblicazioni precedenti alla data d'iscrizione al Dottorato in Medicina Molecolare.

Avanzi GC, Castello L, **Sainaghi PP**, Bergamasco L, Boldorini R, Bartoli E. A malignant fibroleiomyoma of the testis. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2006 Mar;6(5):414-6.

Castello L, **Sainaghi PP**, Bergamasco L, Letizia C, Bartoli E. Pathways of glomerular toxicity of cyclosporine-A: an "in vitro" study. *J Physiol Pharmacol*. 2005 Dec;56(4):649-60.

Bartoli E, Castello L, **Sainaghi PP**, Schianca GP. Progression from hidden to overt type 2 diabetes mellitus: significance of screening and importance of the laboratory. *Clin Lab*. 2005;51(11-12):613-24.

Carnevale Schianca GP, **Sainaghi PP**, Castello L, Rapetti R, Limoncini AM, Bartoli E. Comparison between HOMA-IR and ISI-gly in detecting subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006 Mar-Apr;22(2):111-7.

Castello L, Pirisi M, **Sainaghi PP**, Bartoli E. Quantitative treatment of the hyponatremia of cirrhosis. *Dig Liver Dis*. 2005 Mar;37(3):176-80.

Castello L, Pirisi M, **Sainaghi PP**, Bartoli E. Hyponatremia in liver cirrhosis: pathophysiological principles of management. *Dig Liver Dis*. 2005 Feb;37(2):73-81.

Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol*. 2005 Jul;204(1):36-44

Bartoli E, Castello L, **Sainaghi PP**. [Diagnosis and therapy of hyponatremia]. *Ann Ital Med Int*. 2003 Oct-Dec;18(4):193-203.

Guidetti F, Grazioli S, Capelli F, Marini C, Gallicchio M, De Micheli D, Castello L, **Sainaghi PP**, Fra GP, Saglio G, Avanzi GC. Primitive hematopoietic stem cells shows a polyclonal pattern in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2004 Jan;89(1):21-8.

Carnevale Schianca GP, Rossi A, **Sainaghi PP**, Maduli E, Bartoli E. The significance of impaired fasting glucose versus impaired glucose tolerance: importance of insulin secretion and resistance. *Diabetes Care*. 2003 May;26(5):1333-7.