



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA MOLECOLARE

TESI DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE  
XXI CICLO

“Ruolo della proteina Gas6 nell'inflammazione”

RELATORE:

Chiar.mo Prof. Gian Carlo Avanzi

CANDIDATO:

Dott.ssa Federica Alciato

Anno Accademico 2008-2009

# **INDICE**

INTRODUZIONE	4
GAS6 (Growth Arrest Specific 6)	7
I MONOCITI MACROFAGI E L'INFIAMMAZIONE	10
LA DISPNEA ACUTA	14
LE NEUROPATIE INFIAMMATORIE	15
Sclerosi Multipla	16
<i>Patogenesi</i>	16
Sindrome di Guillain-Barrè (GBS)	17
<i>Patogenesi</i>	18
CIDP (Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy)	18
<i>Patogenesi</i>	18
<i>Risposta immunitaria cellulo mediata</i>	19
<i>Risposta immunitaria umorale</i>	20
EPATOPATIA CRONICA	20
IL DANNO ARTICOLARE	23
Artrite Reumatoide	23
<i>Definizione</i>	23
<i>Eziologia</i>	23
<i>Meccanismi immunopatologici</i>	23
<i>Terapia</i>	24
Artrite Psoriasica	24
<i>Definizione</i>	24
<i>Meccanismi fisiopatologici</i>	24
<i>Terapia</i>	25
Marcatori sierici di danno articolare	25
SCOPO DEL LAVORO	27
MATERIALI E METODI	29
COLTURE CELLULARI	29
Materiali	29
Metodo	29

DIFFERENZIAZIONE E STIMOLAZIONE	29
Materiali	29
Metodo	30
ESPERIMENTI DI MODULAZIONE DELLA SECREZIONE DI CITOCHINE CON LA PROTEINA GAS6	30
Materiali	30
Metodo	31
ISOLAMENTO E COLTURA DI MONOCITI	32
Materiali	32
Metodo	32
DOSAGGIO DI GAS6	33
Materiali	33
Metodo	33
DOSAGGIO DELLE CITOCHINE	34
Materiali	34
Metodo	35
DOSAGGIO DI PHOSPHO-Axl	36
Materiali	36
Metodo	37
IMMUNOBLOT (WESTERN BLOT) PER PHOSPHO-Mer	37
Materiali	37
Metodo	38
EMSA (electrophoretic mobility shift assay)	39
Materiali	39
Metodo	39
<b>RISULTATI</b>	<b>40</b>
GAS6 INFLUENZA LA PRODUZIONE DI CITOCHINE NELLA LINEA CELLULARE U937	40
CONFERMA DEI RISULTATI SU MONOCITI ISOLATI DA SANGUE INTERO	42
L'EFFETTO DI GAS6 E' MEDIATO DAL RECETTORE Mer	43
STUDIO DEL SEGNALE	45
ANALISI DI UNA CASISTICA DI PAZIENTI CON DISPNEA ACUTA	48

ANALISI DI UNA CASISTICA DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIE NEUROLOGICHE SU BASE INFIAMMATORIA	49
ANALISI DI UNA CASISTICA DI PAZIENTI CON EPATOPATIA CRONICA	54
ANALISI DI UNA CASISTICA DI PAZIENTI CON PATOLOGIE REUMATOLOGICHE	56
DISCUSSIONE	59
BIBLIOGRAFIA	72

## **INTRODUZIONE**

Il nostro studio si concentra sul ruolo della proteina Gas6 nell'inflammatione. Il razionale si basa su studi precedenti in cui sono stati descritti gli effetti dell'assenza di ognuno dei singoli recettori del Gas6 (Axl, Tyro3, Mer) ed i risultati ottenuti su un triplo mutante (TAM). I topi con il genotipo Mer<sup>-/-</sup> sono caratterizzati da retinite pigmentosa (è 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)) e cecità (D'Cruz et al., 2000; Gal et al., 2000), aumentata sensibilità al lipopolisaccaride (LPS) e conseguente shock endotossico, e una ritardata clearance delle cellule apoptotiche (Camenish et al., 1999; Cohen et al., 2002; Scott et al., 2001).

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 linfoidi e mieloidi non sono diverse da quelle dei topi wild type. 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 Mer sembra quello che ha peso maggiore (Lu et al., 2001). Una caratteristica dei topi TAM è quella della proliferazione aberrante dei linfociti T e B, con un rapporto T/B e CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 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. 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). In effetti se si trasferiscono cellule B e T da un topo wild ad uno TAM, queste cellule adottano un aspetto TAM (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.

Da questi studi emerge quindi come il macrofago sia l'attore principale nel contesto infiammatorio venutosi a creare in seguito al mancato effetto della proteina Gas6 (Lu et al., 2001; Lemke et al., 2003). Questo ci ha indotto, nella prima parte di questo studio, a concentrarci sugli effetti che Gas6 può avere sulle cellule U937 e su monociti isolati da prelievo di sangue periferico, stimolati con LPS.

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 tondeggiante 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 granulare (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 $\gamma$ , le U-937 si dimostrano fenotipicamente macrofagi (Grolleau e Sonemberg, 1999) ed esprimono le stesse competenze infiammatorie (compresa la produzione di anione superossido) dei macrofagi maturi (Joyce e Steer, 1992).

Per questo la linea cellulare U937 è comunemente utilizzata nei laboratori di ricerca come modello sperimentale di studio dei monociti-macrofagi umani.

Nel nostro studio abbiamo inteso valutare su cellule U937 e su monociti isolati l'effetto del Gas6 sui meccanismi dell'infiammazione. Recenti studi hanno ulteriormente approfondito il meccanismo tramite cui la mancanza di uno o più recettori di Gas6 possa determinare l'attivazione macrofagica. E' 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 (chinesi di I $\kappa$ B), inibendo la liberazione di NF $\kappa$ B dal complesso con I $\kappa$ B e quindi inibendone la sua traslocazione nel nucleo con conseguente attivazione di trascrizione di geni di citochine proinfiammatorie tra cui il TNF- $\alpha$  (Sen et al., 2006). Nel nostro lavoro ci siamo quindi proposti di valutare anche quali segnali vengano attivati dopo il legame tra il Gas6 e il recettore nei monociti/macrofagi.

Nella seconda parte dello studio abbiamo ritenuto opportuno valutare se Gas6 fosse coinvolto in alcune malattie infiammatorie.

Ci siamo concentrati su alcune patologie neurologiche su base infiammatoria come:

- **Sindrome di Guillain-Barrè.** La Sindrome di Guillain-Barrè (GBS) è una poliradicoloneurite acuta, ad esordio rapido, che può evolvere a paralisi totale e insufficienza respiratoria nell'arco di giorni dall'esordio (Kuwabara, 2004).
- **Polineuropatia infiammatoria demielinizzante cronica (CIDP).** È considerata la variante cronica della Guillain-Barrè, e può presentarsi con attacchi ripetuti o con un andamento lentamente progressivo.
- **Neuropatie croniche con autoanticorpi** verso i nervi periferici. In alcune neuropatie, si sono identificati anticorpi diretti contro specifici componenti del nervo periferico, tra cui la Glicoproteina Associata alla Mielina (MAG), i gangliosidi (GM1, GD1a, GD1b), i sulfatidi (Nobile et al., 2004)
- **Neuropatie associate a vasculite:** diverse malattie reumatologiche, come l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso sistemico, la panarterite nodosa, o la sindrome di Sjögren sono associate a vasculite generalizzata, che può coinvolgere anche i nervi periferici (Kissel e Mendell, 1992).
- **Neuropatie associate a gammopatie monoclonali.** Nelle gammopatie monoclonali, singoli cloni di linfociti B o plasmacellule nel midollo osseo o negli organi linfoidi si espandono a formare tumori, benigni o maligni, che secernono anticorpi. Ogni singolo clone di linfociti B produce un solo tipo (monoclonale) di anticorpi (o gamma-globuline), da cui il nome di gammopatia monoclonale. In alcuni casi gli anticorpi reagiscono contro componenti dei nervi

periferici, in altri casi frammenti degli anticorpi si depositano nei tessuti formando "amiloide" (Meier e Meyer, 1990).

Abbiamo prestato particolare attenzione alle patologie neuroinfiammatorie anche in seguito agli studi di Prieto che dimostrano come il recettore Tyro3 per Gas6 abbia una netta prevalenza nel sistema nervoso centrale e in particolare nel cortex e nell'ippocampo (Prieto et al., 1999; Prieto et al., 2007).

In seguito abbiamo valutato pazienti affetti da epatopatia cronica, in particolare quando l'evento primario è un'infezione da hepatitis C virus (HCV). Nel momento in cui avviene l'infezione, l'organismo risponde creando uno stato infiammatorio, con richiamo di monociti/macrofagi e aumento della concentrazione di tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , necessario all'eliminazione del patogeno.

Inoltre studi precedenti evidenziano come, inducendo un danno epatico nei ratti, si assista all'induzione della proteina Gas6.

Abbiamo inoltre considerato pazienti affetti da artropatie autoimmuni come l'artrite reumatoide, che risulta tra le patologie sviluppate dai già citati topi TAM, a causa della costitutiva attivazione del sistema immunitario e la conseguente degenerazione dei diversi tessuti non immunitari causata dalla mancanza dei tre recettori della proteina Gas6 (Lu et al., 2001; Lemke et al., 2003).

Infine abbiamo preso in esame altre patologie che causano dispnea acuta e che possono dare luogo ad attivazione dei processi infiammatori. La dispnea acuta annovera tra le diverse cause scatenanti infezione polmonare e tromboembolia polmonare. L'infezione polmonare risulta di nostro interesse in quanto reazione infiammatoria nei confronti di microrganismi patogeni a carico del parenchima polmonare. La tromboembolia polmonare è importante invece data la presenza in letteratura di due lavori di Angelillo-Scherrer volti a dimostrare nel topo come la presenza di Gas6 sia fondamentale per la stabilizzazione del trombo e come l'inibizione della proteina invece protegga l'animale da trombosi (Angelillo-Scherrer et al., 2001; Angelillo-Scherrer et al., 2005).

### ***GAS6 (Growth Arrest Specific 6)***

È 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 G<sub>0</sub> (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  $\gamma$ -carbossiglutammico, una regione centrale caratterizzata da sequenze ripetute EGF



(Epidermal Growth Factor)-like e una regione C-terminale globulare SHBG (Sex Hormone Binding Globuline)-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)

	<b>TOPO</b>	<b>UOMO</b>
<b>mRNA</b>	Cuore Polmone Epitelio gastrico Rene SNC Cellule del Sertoli Cellule del Leydig Cheratinociti	Polmone Epitelio intestinale Midollo osseo Cellule endoteliali
<b>PROTEINA</b>	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., 1997; Lu et al., 1999; Manfioletti et al., 1993; Mark et al., 1994; Melaragno et al., 1998; Nakano et al., 1995; O'Donnell 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, Tyro3 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 (Schneider et al., 1988). 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- $\alpha$  (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 Umbilical Vein Endothelial Cells) *in vitro*, sia deprivate dei fattori di crescita sia pretrattate con TNF- $\alpha$ . 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 omofilo/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 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ), dal fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 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<sup>-/-</sup>) 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<sup>-/-</sup>. 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).

## **I MONOCITI-MACROFAGI E L'INFIAMMAZIONE**

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 recettori per: 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).

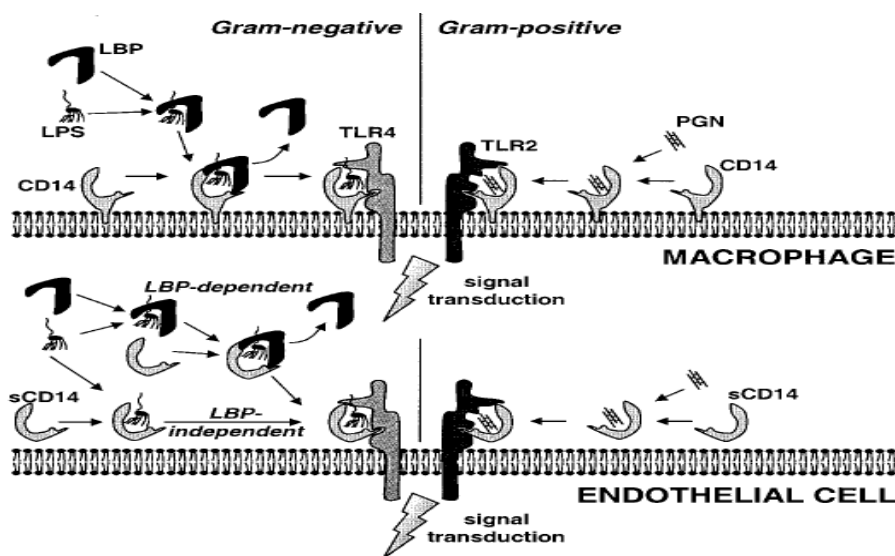
I macrofagi naturalmente intervengono come modulatori della flogosi rilasciando le citochine immunoregolatrici. Inoltre i macrofagi sono cellule presentanti l'antigene (APC) sulle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MCH) di classe II intervenendo quindi nel riconoscimento della noxa e nella conseguente attivazione del sistema immunitario. Inoltre tutti i fagociti (monociti-macrofagi, e granulociti polimorfonucleati neutrofili) 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 microbicidi, nonché alla secrezione di diversi mediatori infiammatori chiave (tra questi per primi spiccano il TNF- $\alpha$ , 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 microbicidi (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). E' stato evidenziato "in vivo" che il LPS è per la maggior parte complessato a proteine LBP (Ramadori et al., 1990; Tobias et al., 1993). 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 µg/ml), ma aumentano molto nella fase acuta dell'infiammazione; 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 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 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- $\alpha$  (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 monomerica 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- $\alpha$ ,

tramite una via mediata dalle proteine TRAF, TRAK, NIK e IKK che fosforila IKB liberando e permettendo la migrazione nel nucleo del fattore di trascrizione NFκB (Miggin et al., 2006). E' stata però studiata un'altra via, forse attivata da TLR2, mediata da AKT e GSK3β, proteina che funzionerebbe a switch, attivando inizialmente NFκB, 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).

## **LA DISPNEA ACUTA**

La dispnea è la difficoltà soggettiva di respirazione. Può essere causata da differenti tipi di patologie a carico del sistema cardio-polmonare.

Una delle cause primarie di dispnea è la tromboembolia polmonare, condizione clinica legata alla migrazione di materiale trombotico dalla circolazione venosa sistemica all'albero vascolare polmonare, con ostruzione della circolazione arteriosa polmonare. Viene considerata un'emergenza medica a causa dell'alto tasso di mortalità e morbilità a cui è associata. Nonostante i numerosi studi condotti a proposito della diagnosi di tale malattia, non è ancora stato scoperto un marker specifico e sensibile che permetta di formulare una diagnosi in regime d'urgenza. Attualmente il processo diagnostico prevede la determinazione della concentrazione plasmatica del D-dimero, che permette di escludere la patologia ma non di confermarla, e l'indagine scintigrafia perfusionale che presenta però limiti nell'applicazione.

Un'altra causa sono le disfunzioni cardiache, quali una ridotta contrattilità, una ridotta funzionalità valvolare, oppure infarto ed ischemia oppure delle infezioni a livello polmonare. In generale, tutte le condizioni patologiche che portano ad uno scompenso cardiaco con formazione di un versamento che va ad impedire il corretto scambio gassoso a livello polmonare, portando come risultato la sensazione di "fame d'aria" tipica della dispnea.

La diagnosi differenziale della dispnea acuta è ritenuta una sfida ancora aperta, poiché a tutt'oggi non esiste un metodo per riconoscere rapidamente e senza dubbi quale sia la patologia scatenante, cosa che risulta fondamentale soprattutto in sede urgentistica. Esiste soltanto una esigua lista di marcatori sierici, come B-type natriuretic peptide (BNP), cardiac troponin I (cTNI) and C-reactive protein (CRP) (Christ et al., 2008), che sono stati studiati come potenziali indicatori dello stato di malattia, oppure il D-Dimero utilizzato nella pratica clinica per l'embolia polmonare (Stein et al., 2006) ma nessuno risulta ancora risolutivo.

Vi sono studi recenti che dimostrano come Gas6 possa essere coinvolto nella patogenesi dell'embolia polmonare; infatti i topi *knock out* per la proteina risultano protetti dall'insorgenza di

tromboembolismo venoso indotto poiché sviluppano trombi più piccoli e meno organizzati e lo stesso vale per topi *wild tipe* trattati con anticorpi anti-Gas6 ( Angelillo-Scherrer et al., 2001; Angelillo-Scherrer et al., 2005).

Altri studi dimostrano il ruolo della proteina Gas6 nel controllo dell'immunità innata e nello sviluppo del processo infiammatorio mettendo in evidenza come topi *knock out* per i tre recettori (Axl, Tyro 3 e Mer) manifestino un'iperattivazione dei monociti/macrofagi, che secernono alti livelli di *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$  ed interleuchina (IL)-6 in seguito a stimolo con lipopolisaccaride (LPS), con maggiore suscettibilità allo shock endotossico e conseguente mortalità (Lu e Lemke 2001; Lemke e Lu 2003).

Alcuni autori hanno anche suggerito il potenziale coinvolgimento di Gas6 nell'infiammazione acuta nell'uomo in seguito al riscontro di un notevole aumento di concentrazione della proteina nel plasma di pazienti affetti da shock settico (Borgel et al., 2006; Gibot et al., 2007).

## LE NEUROPATIE INFIAMMATORIE

Il sistema nervoso è costituito da due parti principali:

- Il sistema nervoso centrale (SNC) che comprende l'encefalo e il midollo spinale
- Il sistema nervoso periferico (SNP) che comprende i nervi che decorrono tra il SNC e gli altri tessuti, oltre alle stazioni nervose di "relay" denominate gangli.

Il sistema nervoso consente una comunicazione rapida e mirata fra aree dell'organismo molto distanti fra loro grazie all'attività di cellule nervose specializzate, che ricevono ed elaborano informazioni, generando appropriati segnali di risposta. L'unità base del sistema nervoso è il *neurone* formato da un corpo cellulare e da un lungo prolungamento chiamato *assone*. Molti assoni sono avvolti da una membrana, detta *guaina mielinica*, che permette agli impulsi elettrici di trasmettersi in maniera più veloce ed efficiente (Stevens e Lowe, 1999).

La guaina mielinica è formata dagli oligodendrociti nel SNC e dalle cellule di Schwann nel SNP.

L'isolamento mielinico si estende per piccoli segmenti lunghi circa 1-2 mm, intervallati da zone chiamate nodi di Ranvier che solo nel SNP sono parzialmente ricoperti da appendici di citoplasma delle cellule di Schwann. Mentre un oligodendrocita può mielinizzare diversi assoni adiacenti, una cellula di Schwann ne può avvolgere uno soltanto (Stevens e Lowe, 1999).

La mielina del nervo periferico differisce da quella del SNC per la presenza di differenti proteine. In particolare la proteina zero (P0) e la proteina 2 (P2) e proteina 22 (PMP22) della mielina periferica;



la proteina basica della mielina (MBP) e le glicoproteine associate alla mielina (MAG) in tutto il sistema nervoso; la proteina proteolipidica (PLP) nella mielina del SNC e gangliosidi e glicolipidi correlati (Stevens e Lowe, 1999).

Queste molecole sono state identificate come antigeni bersaglio per la risposta anticorpale in varie malattie infiammatorie e demielinizzanti sia nel SNP sia nel SNC (Hughes e Cornblath 2005; Köller et al., 2005; Monaco, 2004).

Il SNC è dotato di un suo specifico corredo di cellule immunitarie di cui le principali sono le cellule microgliali, un tipo di macrofagi specializzati. Si tratta di cellule dendritiche presentanti l'antigene (APC), dotate di un basso livello di attività fagocitaria ed esprimenti molecole MHC di classe II. In condizioni patologiche, le cellule microgliali si attivano e aumentano in grandezza e numero. In queste occasioni sono in genere affiancate da monociti, che penetrano nel cervello dal sangue e si trasformano in macrofagi (Stevens e Lowe, 1999).

### ***Sclerosi Multipla***

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia demielinizzante del Sistema Nervoso Centrale (SNC) caratterizzata da una distruzione multifocale della guaina mielinica che si accompagna ad una reazione infiammatoria con indurimento delle aree colpite (sclerosi) in forma di aree circoscritte di dimensioni che variano da pochi millimetri a qualche centimetro (placche). La distruzione della guaina mielinica, con iniziale conservazione dell'assone, determina un'alterazione della conduzione dell'impulso lungo le vie nervose, con un conseguente rallentamento o interruzione della trasmissione dell'impulso stesso (Bergamini, Bergamasco e Mutani, 2001).

La malattia si manifesta con ricorrenti episodi infiammatori a carico del SNC che inizialmente regrediscono spontaneamente o tramite terapia ma che con il tempo possono determinare un peggioramento progressivo con l'instaurarsi di danni neurologici irreversibili (Bergamini, Bergamasco e Mutani, 2001).

### ***Patogenesi***

Il bersaglio primario della malattia è la mielina. Comunque, gli assoni possono essere danneggiati severamente, come anche gli oligodendrociti che producono la mielina. L'attacco acuto della SM inizia con l'attivazione delle cellule T in periferia da parte di antigeni. Queste cellule T una volta attivate, sono in grado di oltrepassare la BEE, di interagire con le cellule presentanti l'antigene site nell'ambito del SNC, di produrre una serie di citochine pro-infiammatorie e di attivare infine l'endotelio della BEE con conseguente reclutamento di cellule periferiche in grado di mantenere e perpetuare il processo infiammatorio. I macrofagi attivati producono sostanze tossiche per la

mielina come ossido nitrico, radicali liberi dell'ossigeno, e le citochine. Il processo infiammatorio vero e proprio, comincia quando inizia la sintesi dell'IL-12 che favorisce la produzione di IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Tale reazione infiammatoria può auto-limitarsi grazie alla produzione di citochine anti-infiammatorie, determinando la regressione della sua espressione e della conseguente, eventuale, sintomatologia clinica, entro alcune settimane. Nel caso in cui tale processo infiammatorio non riesca ad autolimitarsi, si assiste all'attivazione di ulteriori cellule, per lo più macrofagi, che danno inizio al processo di demielinizzazione tipico della SM che può determinare un danno che va dalla distruzione della guaina mielinica alla degenerazione assonale. La rimielinizzazione si manifesta in shadow plaques. Queste aree sono adiacenti alle aree di demielinizzazione attiva e della distruzione. Le Shadow plaques differiscono dalla mielina normale a causa dell'assottigliamento della guaina mielinica, la breve distanza internodale, e la proliferazione di cellule oligodendrogliali in quest'area. Le cellule che producono la mielina nel sistema nervoso periferico, le cellule di Schwann, possono migrare alle aree demielinizzate del sistema nervoso centrale. Questa migrazione è più frequentemente vista vicino alla zona dell'entrata e dell'uscita della radice nervosa. Con il progredire della malattia, la demielinizzazione distrugge anche le aree di rimielinizzazione (Holmes et al., 2005).

### ***Sindrome di Guillain-Barré (GBS)***

La sindrome di Guillain-Barré è una poliradiculoneurite infiammatoria acuta demielinizzante.

L'eziologia è ignota, si manifesta frequentemente dopo un episodio infettivo, che coinvolge nella maggior parte dei casi il tratto respiratorio o gastrointestinale e i cui agenti infettivi più frequentemente implicati sono il Citomegalovirus, il virus di Epstein-Barr, il Mycoplasma Pneumoniae e il Campylobacter Jejuni (Jacobs et al., 1998).

Inizia a livello degli arti inferiori e da questi risalgono rapidamente fino a raggiungere la massima estensione, con il coinvolgimento di tutti e 4 gli arti. Dal punto di vista motorio, si ha paresi accompagnata a ipotonia e areflessia tendinea. I sintomi sensitivi sono frequenti con profonde parestesie e dolori. In seguito, i disturbi si possono estendere anche ai nervi cranici con diplegia facciale o parestesie trigeminali. In presenza di disturbi sfinterici, si può osservare incontinenza urinaria (transitoria). La malattia è autolimitante, con recupero spontaneo nell'arco di 6-8 settimane, ma talora permangono degli esiti. La prognosi favorevole assegnata alla sindrome deve tener conto del rischio di gravi complicazioni respiratorie, che sono conseguenza di paralisi dei muscoli respiratori (Monaco, 2004).

### Patogenesi

Sebbene le evidenze epidemiologiche abbiano portato a formulare diverse ipotesi sul possibile nesso patogenetico tra gli antecedenti infettivi e il danno nervoso nella malattia l'ipotesi attualmente più accreditata è quella che la malattia sia causata da una risposta immunitaria primariamente diretta contro un antigene o un epitopo presente sull'agente infettivo, che è presente anche a livello del tessuto nervoso che viene pertanto coinvolto nella risposta immunitaria per un fenomeno di mimetismo molecolare (Nobile et al., 2004). Numerosi dati avvalorano l'ipotesi sia di un coinvolgimento dell'immunità cellulo-mediata sia di quella umorale nella patogenesi della GBS. Il possibile ruolo dell'immunità cellulare è suffragato da molteplici dati sperimentali: dalla presenza di infiltrati linfocitari a livello del nervo; dal riscontro nel sangue dei pazienti di un elevato numero di linfoblasti circolanti, alcuni dei quali sensibilizzati verso le proteine mieliniche P0 e P2; dagli aumentati livelli serici in fase acuta di citochine pro-infiammatorie e Th1 quali TNF- $\alpha$  e IL-1 che si riducono durante il recupero. Per quanto riguarda invece il possibile ruolo della immunità umorale nella patogenesi della GBS, il dato più rilevante è rappresentato dalla risposta positiva alla terapia con plasmateresi o immunoglobuline ad alte dosi.

### **CIDP**

#### ***(Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy)***

La polineuropatia demielinizzante infiammatoria cronica classica è caratterizzata da debolezza simmetrica in entrambi i muscoli prossimali e distali che aumenta progressivamente per più di due mesi.

La condizione è caratterizzata da danni sensitivi, riflessi tendinei assenti o diminuiti, un elevato livello proteico nel liquido cerebrospinale con aspetti elettrofisiologici di demielinizzazione e quadro istologico di demielinizzazione periferica con infiltrato infiammatorio nei campioni biopsiati (Köller et al., 2005).

Il decorso può essere a pousse o cronico e progressivo.

### Patogenesi

Una rete normale, ben bilanciata di cellule immunocompetenti e fattori solubili regolano il sistema immunitario nel compartimento tissutale locale dei nervi periferici, sostenendo la sua integrità. La mancanza delle risposte immunitarie contro gli autoantigeni è la chiave per il mantenimento di selftolerance. Nella polineuropatia demielinizzante infiammatoria cronica, la self-tolerance non viene più mantenuta, e cellule T e cellule B autoreattive, le quali fanno parte del repertorio immunologico normale, si attivano, causando il caratteristico danno organo-specifico delle malattie

autoimmuni (Quattrini et al., 2003). Il concetto del mimetismo molecolare può avere una pertinenza particolare. Il mimetismo molecolare si riferisce ad un processo nel quale l'ospite genera una risposta immunitaria ad un fattore stimolante, più frequentemente un organismo infettivo che condivide epitopi con i tessuti dell'ospite. Soltanto in casi rari, nelle CIDP, per tale risposta sono stati identificati specifici bersagli in modo convincente. Anche se la CIDP avviene raramente nel contesto delle neoplasie, un'associazione con il melanoma è di grande interesse, visto che il melanoma e le cellule di Schwann condividono degli antigeni perché entrambi derivano dai tessuti della cresta neuronale. Tuttavia, l'ipotesi del mimetismo molecolare non può spiegare l'intero spettro immunopatologico e laboratoristico di questa complessa malattia. Sulla base dei dati recenti, la CIDP sembra essere una malattia organo-specifica, immuno-mediata che nasce da una interazione sinergica tra la risposta immunitaria cellulo-mediata ed umorale diretta contro autoantigeni del nervo periferico non completamente caratterizzati.

#### Risposta immunitaria cellulo-mediata

Esistono prove dell'attivazione delle cellule T che possono invadere il tessuto del nervo periferico, attraversando la barriera sangue-nervo. Tale processo è favorito da alterazioni locali della barriera ematoencefalica (Kanda et al., 2004), elevati livelli di molecole di adesione solubili (Previstali et al., 2001), chemochine (Kastenbauer et al., 2003) e metalloproteinasi della matrice (Kieseier et al., 1998; Mathey et al., 1999). Una volta nel sistema nervoso periferico, queste cellule T vanno incontro ad una espansione clonale dopo aver incontrato un antigene presentato su molecole del complesso maggiore di istocompatibilità in presenza di segnali costimolatori. Tali cellule T poi esprimono e secernono citochine come TNF $\alpha$ , interferone- $\gamma$ , e interleuchina-2 (Gold et al., 1999; Mathey et al., 1999). Le cellule T, dunque, attivano macrofagi residenti endoneurali che, a loro volta, rilasciano una schiera di molecole neurotossiche che potenziano la reazione infiammatoria o aumentano l'attività fagocitica e citotossica diretta contro la mielina o le cellule di Schwann. Dall'altra parte, sottopopolazioni specializzate di cellule T possono terminare il processo acuto immunoinfiammatorio secernendo citochine inibenti. Nella CIDP i macrofagi servono anche come cellule presentanti l'antigene, un dato che viene sottolineato dall'espressione di molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II e classe I come la molecola CD1a osservato nei campioni della biopsia del nervo (Van Rhijn et al., 2000). Le molecole costimolatorie B7-1 e B7-2 sono fondamentali per l'efficace presentazione dell'antigene e possono determinare la differenziazione dei linfociti T in un fenotipo di cellule helper tipo 1 o tipo 2, modulando così la risposta immunitaria locale e il decorso clinico della malattia (Köller et al., 2005). La risposta immunitaria cellulare nel sistema nervoso periferico viene regolata strettamente a livello

trascrizionale. Uno dei regolatori chiave, l'NFkB, è fortemente trascritto prevalentemente nei macrofagi nella CIDP (Andorfer et al., 2001).

### Risposta immunitaria umorale

Il contributo degli autoanticorpi nella patogenesi della CIDP è stato suggerito più di 20 anni fa sulla base della deposizione di immunoglobuline e complemento nelle fibre nervose mielinizzate. Inoltre il siero o le IgG purificate dei pazienti con CIDP inducono ad un blocco della conduzione e demielinizzazione nei nervi dei ratti. In questi esperimenti, la proteina zero della mielina di 28-kD è stata identificata come uno dei antigeni bersagli putativi (Köller et al., 2005).

## **EPATOPATIA CRONICA**

Con il termine di fibrosi epatica si intende l'accumulo di tessuto di tipo "cicatriziale" nell'ambito del fegato, che si può osservare in quasi tutte le condizioni di danno cronico al fegato. Il fegato, come altri tessuti, è composto da cellule parenchimali, che svolgono la maggior parte delle funzioni alle quali è deputato il tessuto. Oltre a queste cellule ne sono presenti altre, definite non parenchimali, che sono responsabili dell'afflusso di sangue, costituendo i vasi sanguigni, della difesa dell'organo da agenti infettivi, e di funzioni di sostegno. Il tessuto epatico, come altri tessuti, è infatti tenuto insieme da una struttura costituita da cellule non parenchimali, definita "matrice extracellulare". La matrice si trova tra le varie cellule e ne permette in maniera ottimale gli scambi di informazioni ed è critica per le funzioni dell'organo. Nel fegato normale la matrice è rappresentata per lo più da una trama delicata che circonda gli epatociti e li separa dai vasi sanguigni permettendo gli scambi. In corso di fibrosi la matrice del fegato cambia le sue caratteristiche in maniera qualitativa e quantitativa. Infatti, aumentano le componenti fibrillari che formano dei tralci attraverso la struttura del tessuto. Inoltre la quantità totale di matrice aumenta notevolmente a scapito di altre componenti cellulari del tessuto.

Queste alterazioni pregiudicano in maniera talora irreversibile le funzioni del fegato.

Il danno epatico può essere prodotto da molti fattori tra cui anche l'infezione da virus HCV e, talvolta da coinfezione con HBV. In seguito all'infezione, in primo luogo il fegato diviene sede di infiammazione, perché dal sangue giungeranno globuli bianchi per neutralizzare l'agente che ha scatenato il danno. L'infiammazione è quindi un processo necessario per la corretta guarigione del tessuto e non deve essere visto necessariamente come un fattore negativo. A questo punto si ha una modificazione della matrice extracellulare da parte dei "miofibroblasti", cellule non parenchimali che colmano i vuoti lasciati dalle cellule distrutte con nuova matrice. Questo evento è necessario non solo per impedire il "collasso" meccanico del tessuto, ma anche per stabilire l'ambiente più

idoneo alla rigenerazione delle cellule nobili. Una volta che l'agente che ha causato il danno sia stato neutralizzato o che la sua azione tossica si sia esaurita, i passi successivi sono rappresentati dalla rigenerazione delle cellule parenchimali, gli epatociti, che ripopolano il tessuto riportandolo alla sua struttura e funzione originarie, e dal ritorno della matrice alle sue caratteristiche normali.

Le cose cambiano qualora il danno al tessuto non sia "acuto" ovvero limitato nel tempo, ma si tratti di un danno cronico, evento piuttosto frequente in caso di infezione da HCV. In questo caso infatti la corretta coordinazione delle varie fasi del processo di guarigione viene persa e si avrà la contemporanea presenza di morte cellulare, infiammazione deposizione di matrice e tentativo di rigenerazione delle cellule parenchimali; aumenteranno drammaticamente i livelli plasmatici di  $TNF\alpha$ , che diventa la molecola chiave per il collegamento tra infiammazione e fibrosi (McCaughan and George, 2008). Questa condizione permane nel tempo poiché l'elemento che causa il danno non scompare, senza consentire una corretta guarigione della ferita. In questo contesto, la matrice extracellulare non viene riassorbita, ma continua ad accumularsi nel tempo determinando il presupposto per lo sviluppo di fibrosi. Si verificano cambiamenti sia quantitativi sia qualitativi nella composizione della matrice extracellulare, essendo prodotti fattori in grado di modulare la crescita cellulare, la migrazione e l'espressione genica di mediatori profibrotici e proinfiammatori con l'innescare di un circolo vizioso. La sostituzione della matrice a bassa densità con quella di tipo interstiziale determina alterazioni della funzione degli epatociti, delle cellule stellate e delle cellule endoteliali, infatti la matrice extracellulare ad alta densità attiva le cellule stellate, favorisce la perdita dei microvilli da parte degli epatociti e determina la scomparsa delle fenestrate endoteliali. Di conseguenza si assiste all'alterazione del trasporto dei soluti dai sinusoidi agli epatociti e alla disfunzione epatocitaria con aumento della pressione portale legata all'irrigidimento dei sinusoidi.

Nell'ambito della patologia epatica cronica le cellule stellate hanno un ruolo preponderante nella produzione di matrice extracellulare. Tale linea cellulare sembra derivare da lipociti che, stimolati da citochine profibrogeniche, si trasformano in fibroblasti. Nel fegato sano le cellule stellate hanno funzione di cellule deposito di vitamina A e tessuto adiposo, contengono vacuoli ricchi di triacilglicerolo e tramite i loro prolungamenti "dendritici" avvolgono la parete endoteliale dei sinusoidi epatici. Tra le loro funzioni è annoverata quella di cellula presentante l'antigene (APC) (Gressner et al, 2007). La loro abilità nel cambiare il proprio fenotipo da cellule di deposito quiescenti a cellule dotate di contrattilità e capacità di secrezione di matrice extracellulare ha fatto acquisire a unità stellate un ruolo di primo piano nell'ambito del processo fibrogenico.

Molti studi sono stati dedicati alla ricerca e alla validazione di nuovi marcatori biochimici non invasivi di fibrogenesi e fibrosi.

Il marker ideale deve essere sensibile e specifico per la fibrosi epatica, deve provvedere a dare misurazione specifica proprio per fibrosi epatica e attività fibrogenetica, non deve essere influenzato da comorbidità (e.g. patologia renale, e al sistema-reticolo endoteliale), il suo dosaggio deve essere facilmente riproducibile ed è necessaria la conoscenza sia della sua emivita che della via di escrezione. I risultati fin'ora ottenuti non indicano in modo univoco e certo la validità di uno o più particolari marcatori. Di conseguenza l'impiego di queste sostanze nella pratica clinica risulta ancora limitato. L'inaffidabilità dei suddetti marcatori è da ricercarsi nella mancanza di riproducibilità, nell'elevato tasso di diagnosi errate e nell'inadeguatezza nell'identificare e nel classificare in modo affidabile gli stadi di fibrosi.

È stato dimostrato come Gas6 sia anche interessato nella risposta al danno tessutale: 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 dalla aggiunta di TNF- $\alpha$  (Bellosta et al, 1997). Inoltre aumenta la proliferazione stimolata da trombina, angiotensina II e acido lisofosfatidico, promuove la sopravvivenza e favorisce la chemiotassi in cellule muscolari lisce vasali (Nakano et al, 1997), infine induce la proliferazione delle cellule di Schwann e le protegge dall'apoptosi (Li et al, 1996). Gas6 non ha alcun effetto sulla crescita o sulla sopravvivenza di fibroblasti umani, delle cellule endoteliali e stromali e dei precursori emopoietici umani (Avanzi et al, 1997).

I dati relativi all'espressione ed alla funzione di Gas6 nel tessuto epatico sono scarsi e limitati all'ambito sperimentale (nel ratto). A nostra conoscenza, è stato pubblicato un singolo, recentissimo articolo che suggerisce come, a livello epatico, questa proteina possa essere implicata nei processi di crescita e sopravvivenza cellulare e nei meccanismi di riparazione e rigenerazione tessutale che avvengono in seguito a insulto acuto e cronico (Lafdil et al, 2006).

Lo studio dimostra, grazie a esperimenti condotti su modelli murini, che nel fegato normale Gas6 è espresso nei macrofagi perisinusoidali mentre nelle cellule stellate quiescenti non risulta essere espresso. In seguito a danno epatico indotto tramite la somministrazione di CCl<sub>4</sub> viene stimolata l'espressione di Gas6 anche nei macrofagi infiammatori e nelle cellule stellate attivate (Lafdil et al, 2006).

Nello studio è stato dimostrato che Gas6 viene secreto dai macrofagi e dalle cellule stellate attivate ed è in grado di esercitare effetti autocrini e paracrini sulle cellule stellate quiescenti e su quelle attivate, nonché sui macrofagi a livello dell'area di parenchima epatico danneggiato. È stato dimostrato inoltre che, somministrando Gas6-ricombinante in cellule stellate in vitro in cui viene indotta apoptosi, avviene l'attivazione di pathway legati a NF $\kappa$ B, un importante induttore della sintesi di proteine con effetti antiapoptotici come bcl-2 e Mcl-1. Emerge dallo studio che

l'interazione Gas6 può essere considerata uno stimolo di sopravvivenza sia per le cellule stellate sia per i macrofagi e questo comporta l'accumulo transitorio di citochine e la produzione di matrice extracellulare, necessari perché avvenga la rigenerazione epatica e la riorganizzazione dell'architettura parenchimale.

## **IL DANNO ARTICOLARE**

### *Artrite Reumatoide*

#### Definizione

L' Artrite Reumatoide (AR) è una malattia autoimmune ad eziologia non definita, caratterizzata da una artrite simmetrica erosiva e, talora, da coinvolgimento extra-articolare (Harris, 1990)

Nella maggior parte dei casi la malattia è caratterizzata da un decorso cronico che, attraverso riacutizzazioni e remissioni, conduce ad una progressiva distruzione delle articolazioni, con deformità e perdita della normale funzione, ad invalidità ed anche ad una riduzione dell'aspettativa di vita.(Hochberg, 1981)

#### Eziologia

L'eziologia dell'AR è largamente sconosciuta, ma si può ipotizzare che un agente esogeno provochi, in soggetti geneticamente predisposti, delle reazioni autoimmuni che perpetuano una reazione infiammatoria nelle articolazioni.

#### Meccanismi immunopatologici

Il ruolo patogenetico fondamentale nell'AR è esplicito dai linfociti T CD4+ , in particolare da quelli che svolgono la funzione Th1, che possono essere cronicamente stimolati o da un antigene esogeno persistente o da un'autoantigene, e che amplificano la risposta immunitaria stimolando altre cellule mononucleate.

L'ipotesi è che ci sia uno specifico richiamo nelle articolazioni di linfociti T cui verrebbe presentato un antigene esogeno da parte delle cellule presentanti l'antigene (APC) e questa teoria è stata avvalorata da più recenti studi sul ruolo delle molecole di homing nella migrazione nella sinovia dei linfociti T, e sul ruolo degli stessi linfociti T nello stimolo osteoclastogenico (Horwood et al, 1999; Gravallesse et al, 2000)

I linfociti T CD4+ attivati determinerebbero, tramite il rilascio di molecole solubili (IL-1, IL-6, TNF, citochine chiave nel guidare l'infiammazione nell'AR) e l'interazione cellulare diretta, l'attivazione dell'endotelio, di macrofagi e di fibroblasti della sinovia. Ciò provoca il rilascio di



metalloproteinasi che degradano il connettivo articolare, ed il successivo richiamo di cellule immunitarie e la proliferazione dei linfociti B (Isler et al, 1993; Varesini et al, 2004).

Il microambiente articolare è caratterizzato, nelle prime fasi dell'inflammatione, da una produzione di citochine infiammatorie e molecole immunoregatorie-antiinfiammatorie sbilanciata a favore delle prime; tra queste  $TNF\alpha$ , IL-1beta, IL-6, IL-15, IL-17, IL-18, IFN-gamma e GM-CSF, che risultano tutte aumentate in corso di AR e variamente correlabili al danno istologico e clinico.

La scarsa produzione di IL-10 potrebbe giustificare lo sbilanciamento verso una risposta di tipo Th1 come si osserva nei pazienti con AR (Yudoh et al, 2000).

Il danno articolare risulta quindi dalla degradazione del connettivo da parte delle metalloproteinasi della matrice e dalla stimolazione dell'osteoclastogenesi da parte dei linfociti T CD4+ attivati (Ernest et al, 2001)

### Terapia

Non esiste cura per l'AR; l'obiettivo del trattamento è limitare il danno articolare, prevenire la disabilità e ridurre il dolore. L'armamentario di medicinali usati nell'artrite reumatoide include gli antinfiammatori non steroidei (FANS), i DMARDs, i corticosteroidi ed i farmaci biologici.

Purtroppo la distruzione articolare spesso prosegue nonostante il trattamento, provocando deformità e disabilità in numerosi pazienti.

## ***Artrite Psoriasica***

### Definizione

L'artrite psoriasica (APs) è una artrite infiammatoria generalmente sieronegativa associata alla psoriasi (Wright e Moll, 1976).

È considerata un sottotipo di spondiloartropatia con tipiche associazioni HLA e caratteristici aspetti immunopatologici, infiammatori e clinici (Gladman et al, 2005).

Non è del tutto noto se l'APs e l'AR siano malattie completamente diverse, o se l'APs sia una forma di AR modificata dalla concomitanza della psoriasi cutanea. Nel complesso, comunque, l'APs è caratterizzata da una sinovite mediamente più lieve di quella dell'AR, con solo una minoranza dei pazienti che sviluppano erosioni

### Meccanismi fisiopatologici

Patogeni virali e batterici sono stati chiamati in causa e si è osservato un elevato livello di anticorpi antistreptococcici nel siero di pazienti con APs (Vasey et al, 1982).

Nelle articolazioni e nelle entesi infiammate si osserva un importante infiltrato di linfociti T, soprattutto di CD8+, con un rapporto CD8:CD4 inverso rispetto a quello osservato nell'AR (Costello et al, 1999).

Le citochine prodotte dai linfociti T, tra le quali IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , sono abbondanti nella sinovia (Ritchlin et al, 1998) e attivano le cellule endoteliali che esprimono così una serie di molecole di adesione che provocano la migrazione linfocitaria nel sito di infiammazione (Veale et al, 1995).

TNF $\alpha$  gioca un ruolo anche nella degradazione della cartilagine tramite lo stimolo alla produzione di metalloproteinasi (Fraser et al., 2003) e stimola anche il rilascio di fattori angiogenetici (VEGF, TGF $\beta$ ), che causano la formazione di neovasi tortuosi tipici della pelle e della sinovia psoriasica (Veale et al, 2005).

Inoltre TNF media numerosi processi biologici che portano al danno articolare tramite l'inibizione della formazione di osso, l'inibizione della sintesi di proteoglicani e lo stimolo al riassorbimento osseo (Cassell e Kavanaugh, 2005).

### Terapia

La diagnosi e il trattamento precoci sono indispensabili per modificare il decorso della APs aggressiva. L'atteggiamento terapeutico dell'APs non differisce da quello adottato nella AR. Vengono usati principalmente FANS e corticosteroidi a bassa posologia.

### ***Marcatore sierici di danno articolare***

L'artrite reumatoide e l'artrite psoriasica sono malattie caratterizzate da infiammazione cronica delle articolazioni che causa la degradazione dei tessuti e la deformazione delle articolazioni.

Il legame tra l'infiammazione cronica e il danno articolare è molto stretto ed è evidente l'importanza dei markers di infiammazione come la VES e la PCR (Graudal et al, 2000)

Tuttavia si è osservato che il danno può progredire nonostante la riduzione dei livelli degli indici infiammatori, e l'erosione articolare può svilupparsi anche in pazienti che hanno pochi segni clinici di infiammazione (van den Berg, 2001).

Per questo è necessario identificare dei fattori predittivi e indicativi di danno articolare al di là di quelli che sono gli indici di flogosi.

Sono stati prodotti molti studi allo scopo di individuare quali variabili di laboratorio potessero essere i markers più affidabili, e quelli più studiati sono stati la PCR e la VES, la proteina oligomerica della matrice cartilaginea (COMP), le metalloproteinasi della matrice (MMP) e tutta

una serie di anticorpi tra cui il fattore reumatoide (FR), gli anticorpi contro le proteine citrullinate (anti-CCP) e gli anticorpi contro l'interleuchina 1 $\alpha$ .

Sono stati investigati anche fattori predittivi genetici come ad esempio l'allele HLA-DRB1, ma i risultati sono apparsi inconsistenti per quanto riguarda la prognosi del danno articolare, della disabilità e della persistenza della malattia (Mottonen et al, 1998).

Nessuno di questi parametri però è risultato risolutivo e, ad oggi, la valutazione di tali patologie si affida a scale cliniche, soggette a variabilità inter e intra operatore, e ad esami strumentali di supporto.

## **SCOPO DEL LAVORO**

Lo scopo del nostro studio è stato 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 di 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 triplomutati non sono in grado di fagocitare le cellule apoptotiche ma sono iperattivi e producono alti livelli di TNF- $\alpha$ .

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

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 siamo proposti 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 è stata stimolata con LPS e trattata con Gas6. L'entità della risposta infiammatoria è stata 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. Abbiamo poi studiato il segnale attivato a valle del recettore per Gas6 coinvolto e le modalità con cui esso è eventualmente in grado di influire sul segnale attivato da LPS. I risultati sono stati poi verificati su monociti isolati da prelievo di sangue

intero. Infine la concentrazione plasmatica della proteina Gas6 è stata analizzata come marcatore dello stato di malattia in casistiche di pazienti affetti da patologie su base infiammatoria.

# **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 NaHCO<sub>3</sub> (bicarbonato di sodio) e L-Glutamina 2 mM (terreno di coltura standard).
- ❖ Fiasche per colture cellulari da 75 cm<sup>2</sup> (IWAKI – Giappone).
- ❖ Trypan blue (C<sub>34</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub>Na<sub>4</sub>, Peso molecolare: 960 g/mol)
- ❖ Camera di Burker (0,0025 mm<sup>2</sup>, profondità 0,100 mm) (FORTUNA<sup>®</sup> - Germania)

### **Metodo**

Le U937 sono seminate in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> (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 (IWAKI-Giappone)

- ❖ Terreno di coltura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) con l'aggiunta di FBS (Foetal Bovine Serum) al 10%, 2 gr/L di NaHCO<sub>3</sub> (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 $\mu$ 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- $\alpha$  (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 (Sigma Aldrich – St. Louis, MO, USA) addizionato con 2 gr/L di NaHCO<sub>3</sub> (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- $\alpha$  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 [CO<sub>2</sub>] = 5 % per 4 giorni per ottenere opportuna differenziazione. Quindi, il terreno standard viene sostituito con RPMI 1640 + 2 gr/L di NaHCO<sub>3</sub> 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O + 6 gr di NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>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)
- ❖ 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- $\alpha$  (Saquin® Amsterdam-Olanda) contenente:
  - Piastre per test E.L.I.S.A (Nunc maxi sorp, Nunc, USA) da 96 pozzetti
  - Anticorpo primario anti-TNF- $\alpha$  (Saquin® Amsterdam-Olanda)
  - Anticorpo biotilato anti TNF- $\alpha$  (Saquin® Amsterdam-Olanda)
  - Anticorpo primario anti-IL-6 (Saquin® Amsterdam-Olanda)
  - Anticorpo biotinilato anti-IL-6 (Saquin® Amsterdam-Olanda)
  - TNF- $\alpha$  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 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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 $\beta$ , IL-10, IL-12, IL-13) sono state dosate tramite un metodo standardizzato che permette di verificare la concentrazione di più antigeni contemporaneamente. Il metodo prevede l'utilizzo di microsfere di polistirene coniugate con l'anticorpo primario. Il campione viene trattato con mix di microsfere 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2 - 7.4.
- ❖ Wash Buffer: 0.05% Tween\_20 in PBS, pH 7.2 - 7.4
- ❖ Block Buffer: 1% BSA\*, 0.05% NaN<sub>3</sub> 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e Color Reagent B (Tetramethylbenzidine)
- ❖ Stop Solution: 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### Metodo

Si parte diluendo il *Capture Antibody* fino ad una concentrazione di 8.0 µg/ml in PBS ed aliquotandone 100 µl 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-mercaptoetanolo (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 dH<sub>2</sub>O
- ❖ 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. Aggiungo il pH a 8.3/8.4. Porto a 3 litri con dH<sub>2</sub>O
- ❖ 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 MgCl<sub>2</sub>, 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 portalastrae 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. Ne emerge che il PMA è in grado di differenziare più efficacemente le U937 rispetto all'acido retinoico in termini di secrezione di TNF- $\alpha$ , e che questo effetto non dipende dalla concentrazione dell'LPS (Tabella 2).

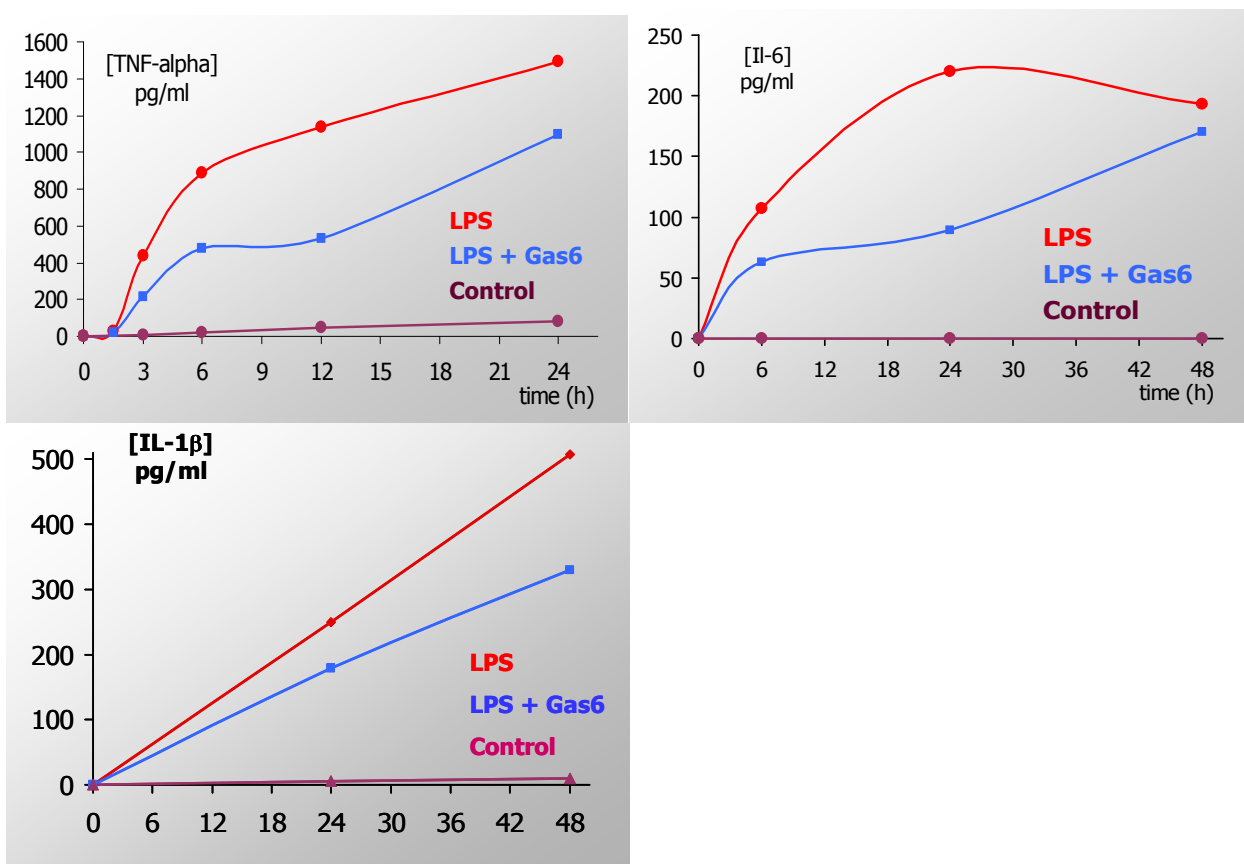
<b>Tipo di differenziante</b>	<b>LPS [ng/ml]</b>			
	<b>10</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>500</b>
<b>Nessun differenziante</b>	0	0	0	0
<b>Ac. Retinoico 1<math>\mu</math>M</b>	36	39	54	74
<b>PMA 5 ng/ml</b>	386	344	368	364

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

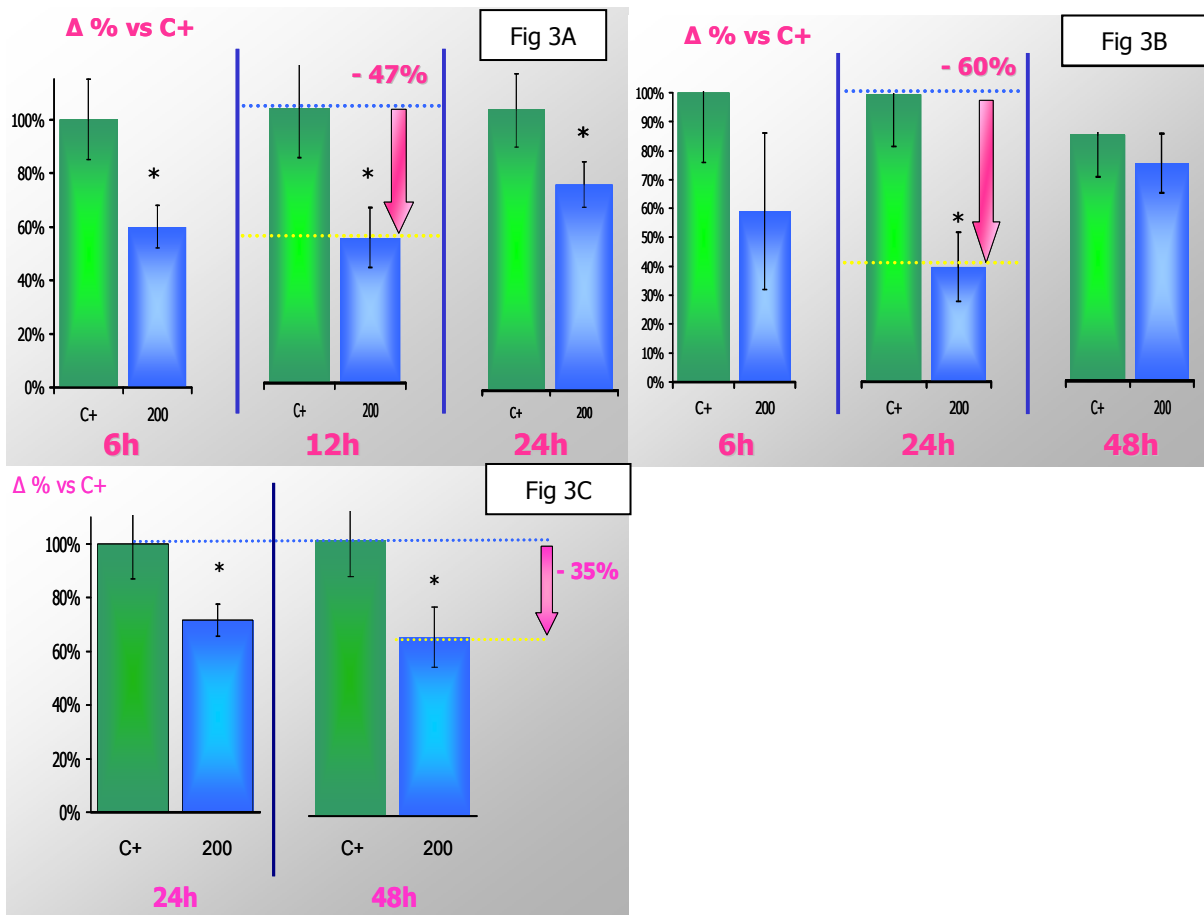
In ulteriori esperimenti abbiamo osservato risultati analoghi anche con concentrazioni di LPS inferiori (5 ng/ml). Questa è la concentrazione poi adottata in tutti gli esperimenti. Abbiamo infine scelto la concentrazione di PMA più efficace: la trasformazione è evidente per le cellule trattate con PMA 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- $\alpha$ , IL-6 ed IL-1 $\beta$ .

Gas6 riduce la concentrazione di TNF- $\alpha$  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 $\beta$  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 per cui ci aspettiamo un'induzione anziché un'inibizione in seguito al trattamento con Gas6 è la citochina anti-infiammatoria IL-10, per la quale però l'effetto riscontrato risulta non statisticamente significativo.



**Figura 2.** Cinetica di produzione delle citochine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  dopo stimolazione con LPS 5 ng/ml (curve rosse) ed effetto del trattamento con Gas6 200 ng/ml (curve blu) rispetto al controllo negativo (curve bordeaux).



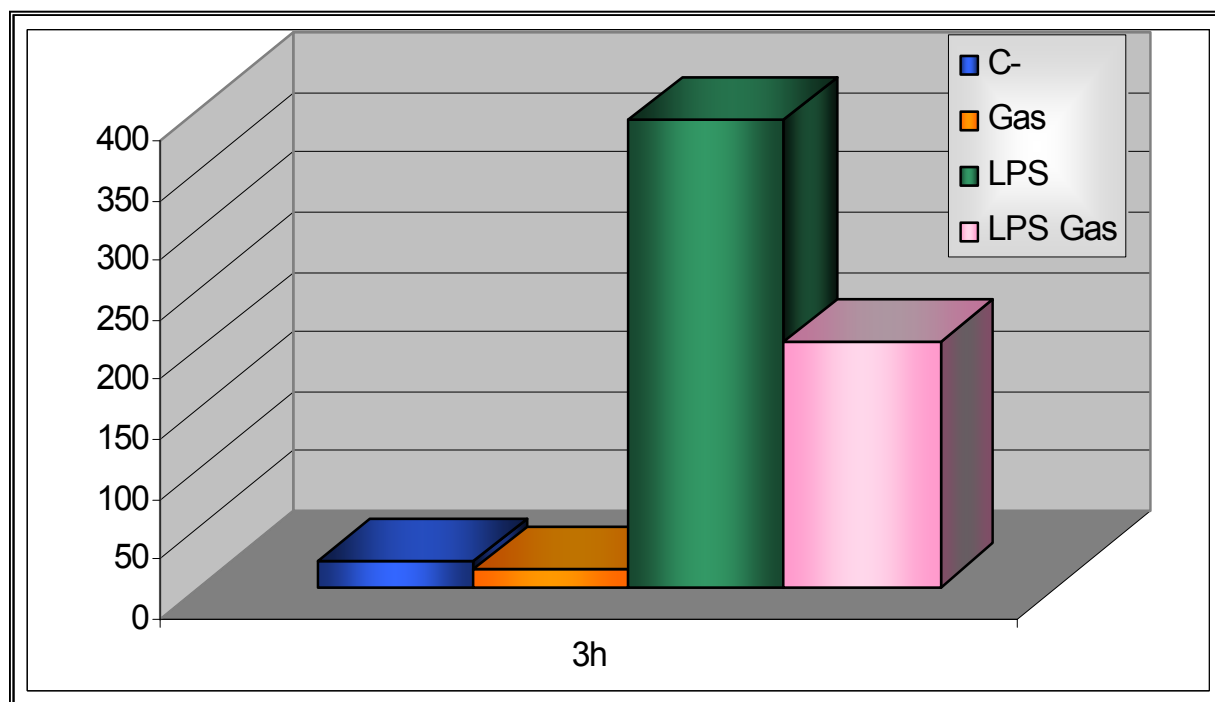
**Figura 3.** Variazione percentuale indotta dal trattamento con Gas6 200 ng/ml su TNF- $\alpha$  (Fig 3A), IL-6 (Fig 3B), IL-1 $\beta$  (Fig 3C) rispetto al controllo positivo (C+) stimolato con solo LPS 5 ng/ml.

### 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- $\alpha$  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- $\alpha$  risulta ridotta del 52%. (Figura 4).

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

### TNF- $\alpha$ in monociti isolati

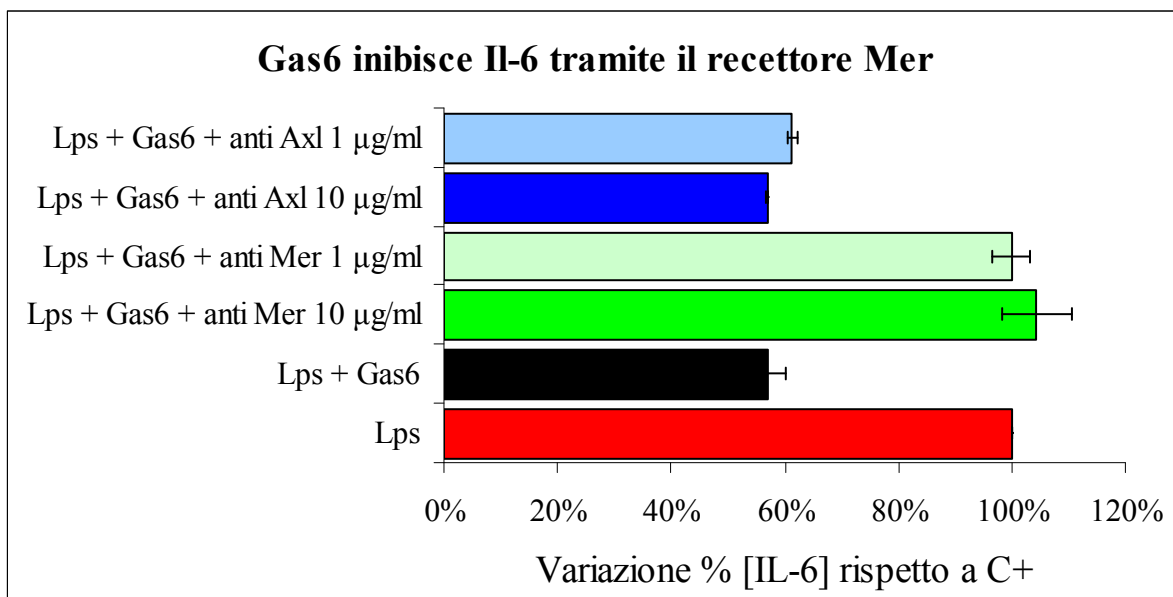


**Figura 4.** Riduzione della concentrazione di TNF- $\alpha$  indotta dal trattamento di monociti isolati con LPS 5ng/ml più Gas6 200 ng/ml rispetto al trattamento con solo LPS.

#### L'effetto di Gas6 è mediato dal recettore Mer

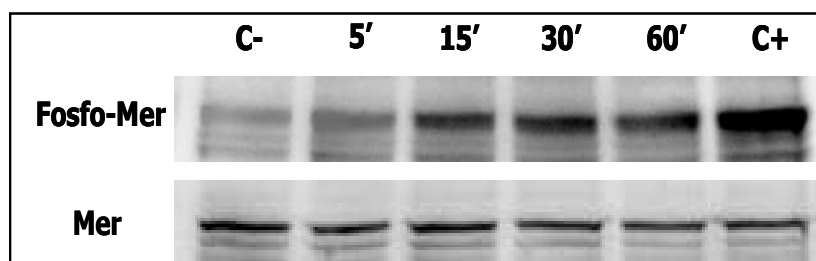
In considerazione del fatto che Gas6 è ligando di tre recettori tirosina chinasi e che almeno due di essi sono espressi dai monociti (Axl e Mer) (Neubauer et al., 1994; Neubauer et al., 1997; Lu e Lemke 2001), abbiamo valutato tramite quale recettore Gas6 fosse grado di ridurre la secrezione di IL-6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

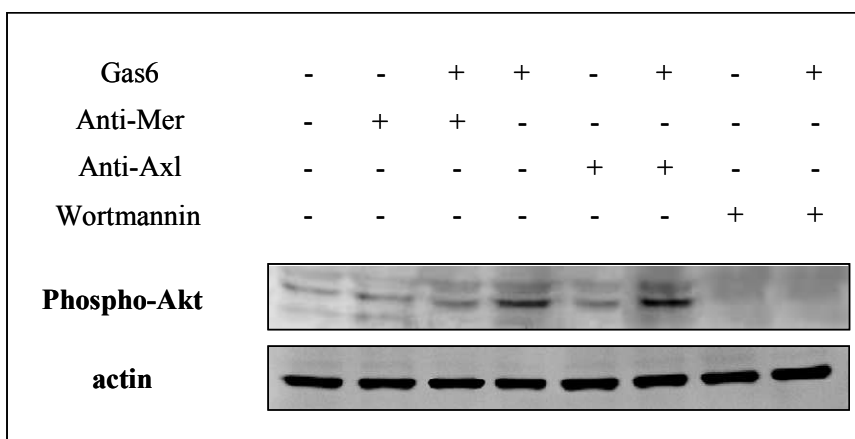
Il risultato è stato verificato analizzando lisati cellulari tramite immunoblotting alla ricerca del recettore Mer fosforilato, cioè nella sua forma attivata. Parallelamente abbiamo analizzato gli stessi lisati tramite un metodo E.L.I.S.A. appositamente creato per rilevare la presenza del recettore Axl 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'

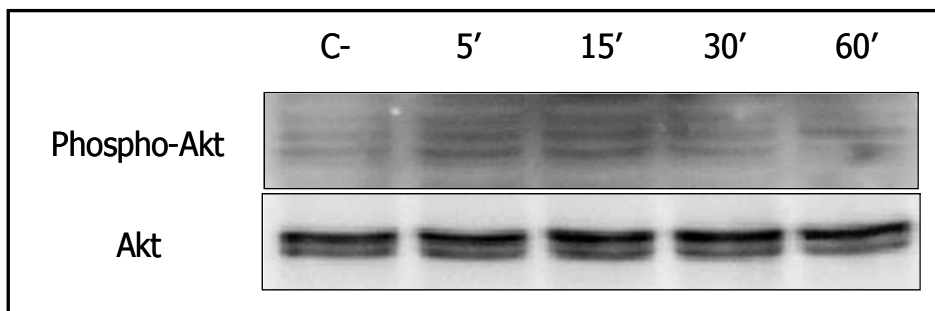
possibile notare come il trattamento con il solo Gas6 provochi un incremento nei livelli di fosforilazione di Akt. La banda ottenuta per il solo Gas6 è paragonabile con quelle ottenute con anticorpo anti-Axl sia in presenza che in assenza di Gas6 mentre trattando con anticorpo anti-Mer l'intensità delle 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). E' stato possibile riscontrare la presenza di Mer, seppur in percentuale molto bassa, anche analizzando lisati di cellule U937 non differenziate, mentre Axl non è stato rilevato.



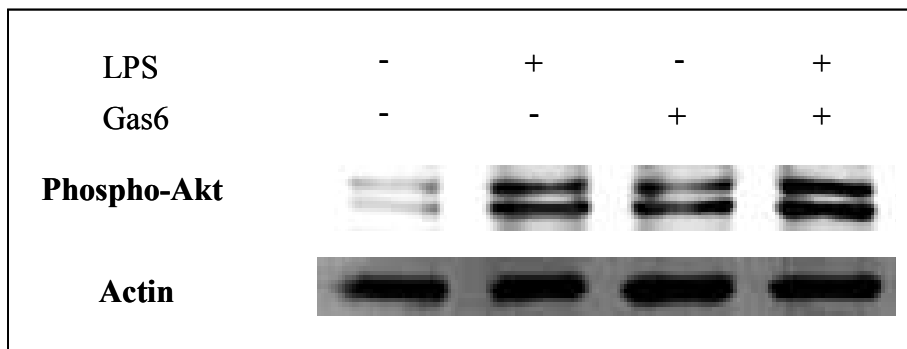
**Figura 7.** Livelli di induzione della proteina Akt in presenza di anticorpi che vanno ad inibire in maniera specifica i recettori Axl e Mer e confronto con wortmannina, inibitore di Akt. L'anticorpo anti-Mer provoca un calo di fosforilazione della proteina Akt.

### 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- $\alpha$  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). Si nota inoltre come Akt, che risulta già fosforilata in presenza del solo LPS, risulti maggiormente attivata in presenza dello stesso LPS concomitante a Gas6 (Figura 9).

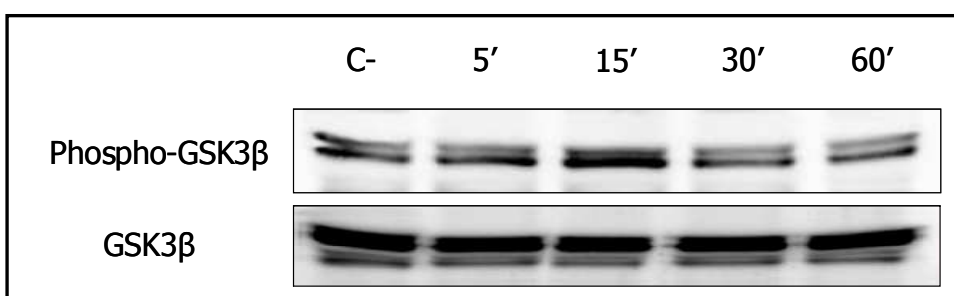


**Figura 8.** Cinetica di fosforilazione della proteina Akt (pannello in alto) e relativo controllo Akt non fosforilato (pannello in basso)

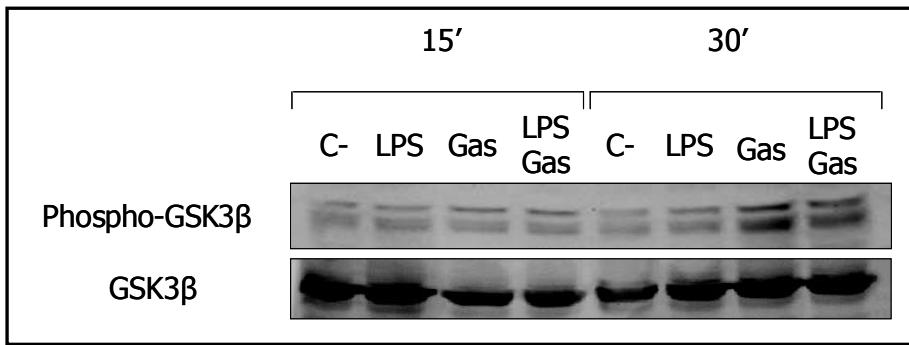


**Figura 9.** Livello di fosforilazione della proteina Akt (pannello in alto) in presenza di solo LPS, di solo Gas6 e di entrambi. La fosforilazione di Akt risulta incrementata in presenza di Gas6.

In secondo luogo abbiamo voluto verificare lo stato di fosforilazione della proteina GSK3 $\beta$ , ritenuta una componente fondamentale per il controllo del set citochinico (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 10 e 11).



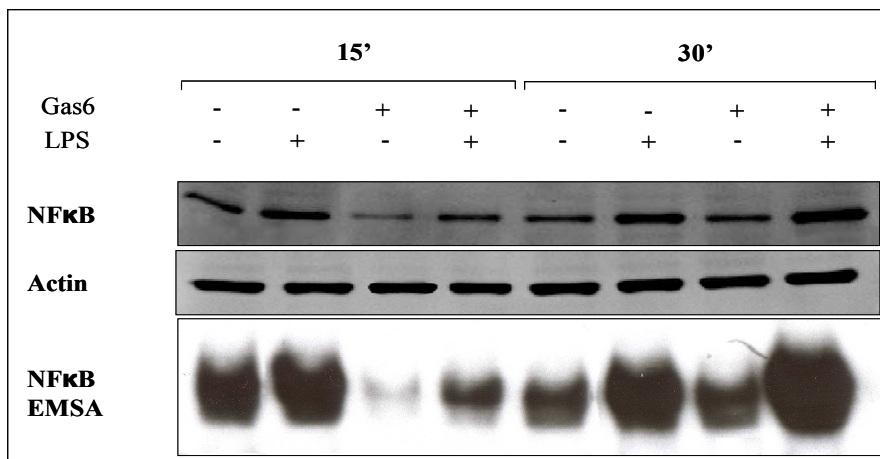
**Figura 10.** Cinetica di fosforilazione della proteina GSK3 $\beta$  (pannello in alto) e relativo controllo GSK3 $\beta$  non fosforilato (pannello in basso)



**Figura 11.** Confronto dei livelli di fosforilazione della proteina GSK3β in presenza ed assenza di LPS 5 ng/ml e Gas6 200 ng/ml (pannello in alto) e relativo controllo GSK3β non fosforilato (pannello in basso)

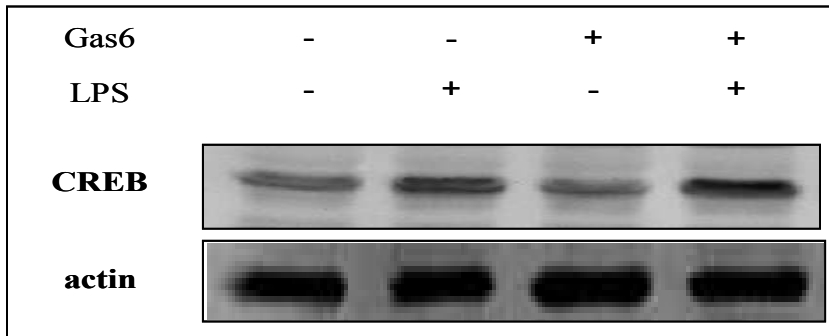
Infine abbiamo testato lo stato di fosforilazione e la funzionalità del fattore di trascrizione NFκB, che si trova a valle della cascata del segnale, tramite esperimenti di immunoblotting e parallelamente tramite EMSA. L'analisi è stata fatta in entrambi i casi su estratti nucleari e i due metodi confermano 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 NFκB fosforilato nel nucleo, compatibilmente con una riduzione della produzione di TNF-α ed IL-6 (Hu et al., 2007) (Figura 12).

Non è stato invece possibile rilevare variazioni di CREB, fattore che controlla la trascrizione di IL-10 (Figura 13).



**Figura 12.** 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)





**Figura 13.** Livelli di fosforilazione del fattore di trascrizione CREB in lisati nucleari analizzati tramite immunoblotting. Creb risulta fosforilato in presenza di LPS e la proteina Gas6 non varia il suo stato.

### **Analisi di una casistica di pazienti con dispnea acuta**

Sono stati reclutati 60 pazienti con dispnea acuta e sono stati divisi in gruppi in base alla loro diagnosi:

- 8 senza patologia
- 12 cardiopatici
- 11 con infezione polmonare o sistemica
- 29 con embolia polmonare

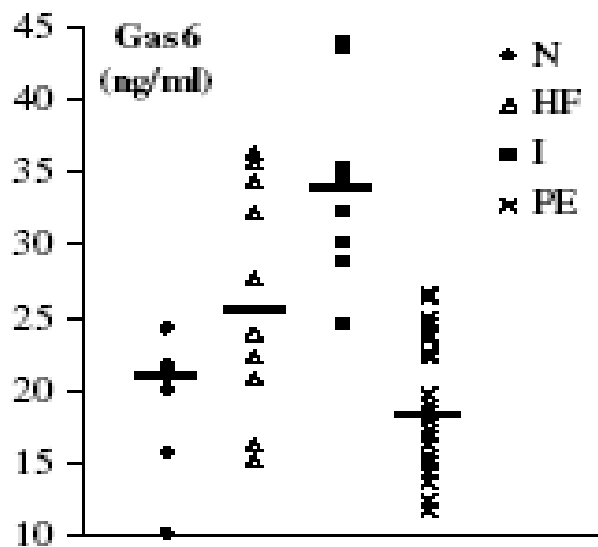
Ognuni di questi è stato confrontato con un gruppo di 39 controlli sani.

Tutte le variabili analizzate non hanno una distribuzione normale in ogni gruppo diagnostico (Shapiro-Wilk,  $p > 0.05$ ).

La concentrazione mediana di Gas6 è risultata uguale nei controlli sani e nei soggetti senza patologia (20.4 ng/ml e 19.1 ng/ml rispettivamente).

Il sesso non influenza la concentrazione plasmatica di Gas6 (Mann-Whitney U-test,  $p=n.s.$ ) e l'età media è paragonabile nei vari gruppi (Kruskall-Wallis,  $p > 0.1$ ).

Dal confronto tra i gruppi è risultato che la concentrazione plasmatica mediana di Gas6 è più elevata nei pazienti cardiopatici o con infezione sistemica o polmonare rispetto ai pazienti con embolia polmonare o ai soggetti sani ( $p < 0.002$ ). Inoltre i pazienti con infezione sistemica o polmonare risultano avere una concentrazione di proteina tendenzialmente più elevata anche rispetto ai soggetti cardiopatici, anche se la differenza non è risultata statisticamente significativa (Figura 14).



*Figura 14.* Distribuzione della concentrazione plasmatica di Gas6 nei gruppi con i valori mediani evidenziati da una linea orizzontale in ogni gruppo. (N= no illness; HF= heart failure; I= infection; PE= pulmonary embolism)

**Analisi di una casistica di pazienti affetti da patologie neurologiche su base infiammatoria**

87 pazienti sono stati suddivisi in diversi gruppi in base alla loro diagnosi come illustrato nella tabella 3.

Diagnosi	Numerosità gruppo
<b>Accertamenti neurologici negativi</b>	<b>9</b>
<b>Patologie non infiammatorie/non autoimmuni</b>	<b>31</b>
Stroke	14
Cefalea	8
Epilessia	3
SLA	6
<b>Patologie infiammatorie/autoimmuni</b>	<b>47</b>
SM/CIS	11
GBS	15
CIDP	8
Altre Polineuropatie	13
<b>Totale</b>	<b>87</b>

*Tabella 3:* Pazienti inclusi nello studio con la reciproca numerosità per patologia.

È stata quindi valutata la concentrazione media di Gas6 nel liquor come riportato nella tabella 4

<b>Diagnosi</b>	<b>Numerosità dei gruppi</b>	<b>[Gas6] * (ng/ml) media +/- dev. st.</b>
Normali	9 (10,3%)	6,3 +/- 1,8
Stroke	14 (16,1%)	6,6 +/- 2,2
Cefalea	8 (9,2%)	5,8 +/- 2,8
Epilessia	3 (3,4%)	4,1 +/- 1,1
SLA **	6 (6,9%)	8,4 +/- 2,4
SM ***	11 (12,6%)	5,2 +/- 1,5
GB ****	15 (17,3%)	7,2 +/- 2,6
CIDP *****	8 (9,2%)	10,8 +/- 2,5
Altre Polineuropatie *****	13 (15,0%)	7,4 +/- 1,5
<b>Totale</b>	<b>87 (100%)</b>	<b>6,9 +/- 2,6</b>

**Tabella 4:** Numerosità dei pazienti per ciascun gruppo con valore medio della concentrazione della proteina Gas6 e rispettiva deviazione standard.

\* Concentrazione della proteina Gas6 nel liquor cefalorachidiano

\*\* Sclerosi laterale amiotrofica

\*\*\* Sclerosi multipla o CIS (Clinically Isolated Syndrome)

\*\*\*\* Sindrome di Guillain Barrè

\*\*\*\*\* Polineuropatia infiammatoria cronica demielinizzante

\*\*\*\*\* Polineuropatie infiammatorie demielinizzanti non rispondenti ai criteri di GBS o CIDP

Abbiamo considerato come valore di riferimento per la normalità la concentrazione di Gas6 ottenuta nel liquor di pazienti con accertamenti neurologici negativi. Il valore medio della concentrazione di Gas6 misurato nel liquor di tali soggetti è:

**[GAS6] = 6,3 ± 1,8 ng/ml**

Come si evidenzia dalla tabella 4 Gas6 risulta mantenere un valore pressoché invariato nelle patologie non infiammatorie/non autoimmuni. Infatti se valutiamo la varianza dei valori medi di Gas6 dei soggetti con patologie non infiammatorie /non autoimmuni con il metodo parametrico

ANOVA non si evidenzia una differenza statisticamente significativa per quanto riguarda il valore di concentrazione di Gas6 nel liquor tra queste patologie ( $p > 0,1$ ).

Di conseguenza abbiamo considerato i pazienti con patologie non infiammatorie come un gruppo omogeneo per le successive analisi statistiche.

Quindi abbiamo confrontato i valori di Gas6 nei seguenti gruppi:

- Normali (9 pazienti)
- Patologie non infiammatorie (31 pazienti)
- GBS (15 pazienti)
- CIDP (8 pazienti)
- Altre polineuropatie (13 pazienti)
- SM/CIS (11 pazienti)

Dall'analisi della varianza condotta risulta che i valori medi di Gas6 di questi gruppi sono significativamente differenti:

- Varianza non parametrica (Test di Kruskal-Wallis):  $p < 0,002$

- Test ANOVA:  $gdl = 5$ ;  $F = 6,7$ ;  $p < 0,0001$

Abbiamo quindi confrontato le medie dei valori della concentrazione del Gas6 dei gruppi analizzati con Test Post Hoc di Tuckey per identificare le differenze esatte tra i valori medi.

È risultato che i pazienti affetti da CIDP presentano valori di Gas6 nel liquor significativamente più elevati rispetto a tutti gli altri gruppi ( $p < 0.05$ ). Tabella 5.

<b>Diagnosi</b>	<b>Normali</b> <i>(media:6,3)</i>	<b>Pat.Non.inf.</b> <i>(media:6,5)</i>	<b>GBS</b> <i>(media:7,2)</i>	<b>CIDP</b> <i>(media:10,8)</i>	<b>Altre Pnp</b> <i>(media:7,4)</i>	<b>SM</b> <i>(media:5,2)</i>
<b>Normali</b>	/	N.S.	N.S.	<b>p&lt;0,002</b>	N.S.	N.S.
<b>Pat.non.inf.*</b>	N.S.	/	N.S.	<b>p&lt;0,004</b>	N.S.	N.S.
<b>GBS**</b>	N.S.	N.S.	/	<b>p&lt;0,025</b>	N.S.	N.S.
<b>CIDP***</b>	<b>p&lt;0,002</b>	<b>p&lt;0,004</b>	<b>p&lt;0,025</b>	/	<b>p&lt;0,041</b>	<b>p&lt;0,0002</b>
<b>AltrePnp****</b>	N.S.	N.S.	N.S.	<b>p&lt;0,041</b>	/	N.S.
<b>SM*****</b>	N.S.	N.S.	N.S.	<b>p&lt;0,0002</b>	N.S.	/

**Tabella 5.** Confronto del valore di Gas6 tra i vari gruppi con Test Post Hoc di Tuckey

\* Patologie non infiammatorie

\*\* Sindrome di Guillain Barrè

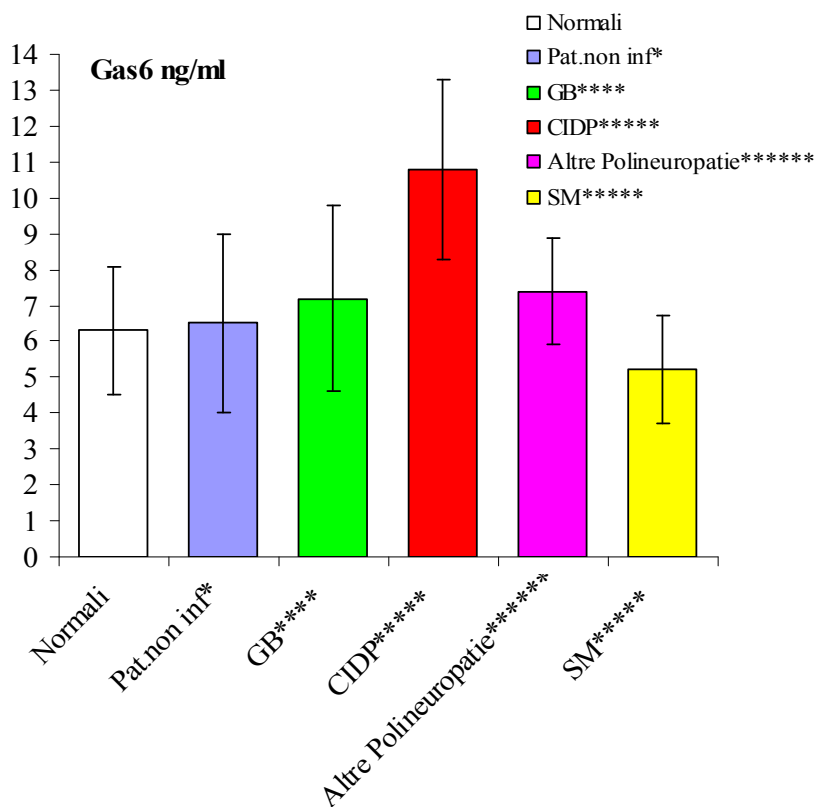
\*\*\* Polineuropatia infiammatoria cronica demielinizzante a

\*\*\*\* Polineuropatie non rispondenti ai criteri di GBS o CIDP

\*\*\*\*\* Sclerosi multipla o CIS (Clinically Isolated Syndrome)

NS = non significativo

Non emergono invece differenze nel confronto tra le altre diagnosi. È interessante segnalare come la GBS, le altre polineuropatie e la SM hanno valori di Gas6 sovrapponibili ai soggetti normali e ai soggetti con malattie non infiammatorie/autoimmuni (vedasi figura 15).



**Figura 15.** Il grafico riporta le medie delle concentrazioni liquorali delle proteine totali e le rispettive deviazioni standard per ogni gruppo analizzato. Vedasi tabella 4 per il confronto statistico.

Allo scopo di determinare l'esattezza della differenza della concentrazione media di Gas6 nei soggetti con CIDP rispetto alle altre diagnosi abbiamo considerato come potenziali confondenti le seguenti variabili (Tabella 5):

1. Proteine liquorali totali
2. Età

L'analisi della varianza ha evidenziato che le medie delle proteine totali liquorali e delle età sono diverse nei vari gruppi ( $p < 0.001$ ).

Quindi attraverso il Test Post Hoc di Tuckey abbiamo confrontato i valori medi delle proteine totali di ciascun gruppo e questi sono risultati più elevati nelle CIDP e nella GBS rispetto ai soggetti normali o con patologie non infiammatorie ( $p < 0,05$ ). Non emerge invece nessuna differenza tra la

concentrazione liquorale proteica nei pazienti con CIDP, GBS o altre polineuropatie (valori medi rispettivamente 101, 115 e 81 mg/dl).

Il medesimo confronto è stato condotto per la variabile “età”. Risulta evidente che i pazienti affetti da CIDP e da altre polineuropatie infiammatorie sono significativamente più anziani rispetto ai soggetti con accertamenti neurologici negativi e affetti da SM. Non emerge invece una differenza di età statisticamente significativa tra i pazienti con CIDP, con GBS o affetti da altre polineuropatie, seppure il gruppo con CIDP presenti età media più alta rispetto agli altri gruppi.

Allo scopo di confermare che i valori di Gas6 nel liquor non sono influenzati dalla concentrazione delle proteine liquorali e dall’età dei pazienti, abbiamo effettuato, attraverso una regressione lineare, una correlazione fra i valori di Gas6 con ciascuna delle variabili considerate.

Inizialmente abbiamo correlato le concentrazioni di Gas6 con l’Età considerando tutti i pazienti e tale correlazione è statisticamente significativa:

$$\text{Gas6} = 0,06 \cdot \text{Età} + 4,0; \quad R^2 = 0,15 \quad p < 0,0002$$

Tuttavia in considerazione del fatto che i pazienti con malattie infiammatorie sono anche in media più anziani, per escludere questo confondimento, abbiamo correlato la concentrazione di Gas6 con l’età solo nei pazienti normali e affetti da patologie non infiammatorie e tale relazione non è più statisticamente significativa:

$$\text{Gas6} = 0,03 \cdot \text{Età} + 5,1; \quad R^2 = 0,05 \quad p > 0,13$$

La stessa relazione è stata valutata per le proteine totali liquorali di tutti i pazienti e nuovamente è stata riscontrata significatività statistica:

$$\text{Gas6} = 0,013 \cdot \text{Età} + 6,1; \quad R^2 = 0,08 \quad p < 0,008$$

Tuttavia tale relazione scompare se si considerano i soggetti normali o affetti da patologie non infiammatorie:

$$\text{Gas6} = - 0,01 \cdot \text{Età} + 6,8; \quad R^2 = 0,007 \quad p > 0,9$$

Ad ulteriore conferma che l’elevazione di Gas6 nei pazienti con CIDP non è dovuta né alle proteine totali liquorali né all’età, abbiamo ripetuto l’analisi della varianza con metodo multivariato (MANOVA) considerando le proteine totali liquorali e l’età come covariate sia singolarmente sia in combinazione. L’analisi multivariata (MANOVA) per i valori medi di Gas6 nei vari gruppi di studio corretta per le proteine totali e l’età ha confermato una varianza della concentrazione di Gas6 statisticamente significativa ( $p < 0,02$ ).

Infine abbiamo confrontato i valori di Gas6 corretti per l’età e per le proteine liquorali nei vari gruppi utilizzando il test post hoc di Tuckey. (Tabella 6)

Tali analisi conferma la differenza della concentrazione di Gas6 nei pazienti con CIDP rispetto a tutte le restanti diagnosi. (Sainaghi et al., 2008)

<b>Diagnosi</b>	<b>Normali</b> <i>(media:6,3)</i>	<b>Pat.non.inf.</b> <i>(media:6,5)</i>	<b>GB</b> <i>(media:7,2)</i>	<b>CIDP</b> <i>(media:10,8)</i>	<b>Altre Pnp</b> <i>(media:7,4)</i>	<b>SM</b> <i>(media:5,2)</i>
<b>Normali</b>	/	N.S.	N.S.	<b>p&lt;0,002</b>	N.S.	N.S.
<b>Pat.non.inf.*</b>	N.S.	/	N.S.	<b>p&lt;0,003</b>	N.S.	N.S.
<b>GBS**</b>	N.S.	N.S.	/	<b>p&lt;0,02</b>	N.S.	N.S.
<b>CIDP***</b>	<b>p&lt;0,002</b>	<b>p&lt;0,003</b>	<b>p&lt;0,02</b>	/	<b>p&lt;0,03</b>	<b>p&lt;0,0002</b>
<b>AltrePnp****</b>	N.S.	N.S.	N.S.	<b>p&lt;0,03</b>	/	N.S.
<b>SM*****</b>	N.S.	N.S.	N.S.	<b>p&lt;0,0002</b>	N.S.	/

**Tabella 6.** Correlazione dei valori di Gas6 corretti per l'età e per le proteine liquorali nei diversi gruppi attraverso il Test Post Hoc di Tuckey.

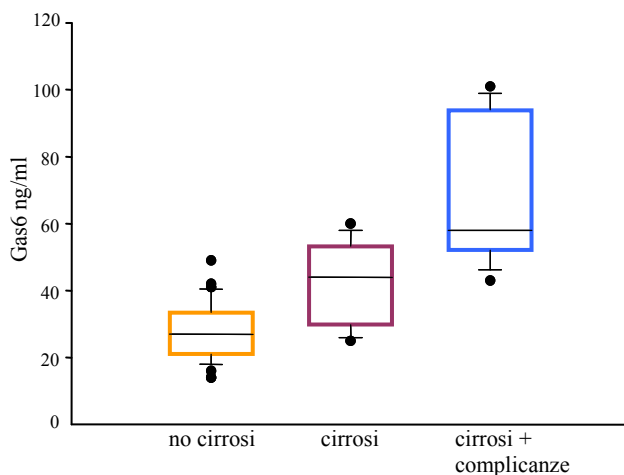
- \* Patologie non infiammatorie
  - \*\* Sindrome di Guillain Barrè
  - \*\*\* Polineuropatia infiammatoria cronica demielinizzante a
  - \*\*\*\* Polineuropatie non rispondenti ai criteri di GBS o CIDP
  - \*\*\*\*\* Sclerosi multipla o CIS (Clinically Isolated Syndrome)
- NS = non significativo

### **Analisi di una casistica di pazienti con epatopatia cronica**

E' stata analizzata la concentrazione plasmatica della proteina Gas6 in pazienti affetti da epatopatia cronica. Il valore di concentrazione medio di Gas6 nel plasma è risultato di 38,4 ng/ml (DS 19,75), circa doppio rispetto alla popolazione generale, in cui Gas6 circolante ha un valore di concentrazione fisiologico di 20 ng/ml.(Tabella 7 e Figura 16).

Parametro	Gas6 (ng/ml)	p
Età		
≤60 aa	34,0±14,3	<0.10
>60 aa	42,9±23,5	
Sesso		
M	35,0±16,2	ns
F	40,9±21,8	
Genotipo Virale		
HCV-1	35,7±17,7	ns
Altri genotipi	32,0±9,1	
Carica virale		
≤800.000 UI	36,2±13,1	ns
>800.000 UI	32,3±11,6	

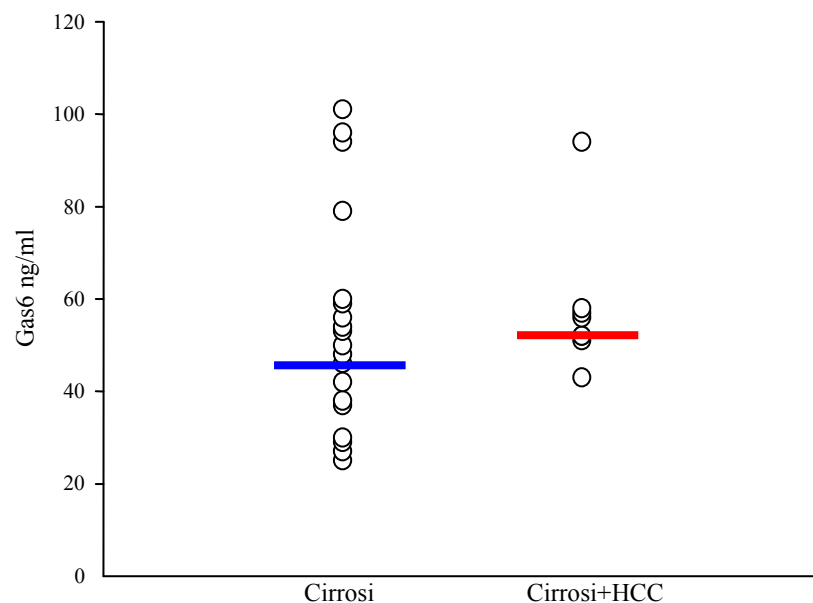
**Tabella 7** presenta la valutazione del dosaggio di Gas6, in funzione di una selezione di variabili demografiche e cliniche.



**Figura 16** presenta il valore di concentrazione plasmatica di Gas6 in funzione della severità di malattia epatica nella popolazione studiata.

Tramite ANOVA a due vie, si è dimostrato che mentre la concentrazione plasmatica di Gas6 non si è rivelata un fattore predittivo per l'evoluzione della patologia in epatocarcinoma (Figura 17), è presente una correlazione statisticamente significativa tra concentrazioni di Gas6 e presenza di cirrosi ( $p < 0,0001$ ). Si è verificato inoltre che la concentrazione di Gas6 non è correlata con l'età ( $p=0,07$ ).





**Figura 17** mostra il confronto tra valore di concentrazione di Gas6 e presenza di HCC nel solo sottogruppo di pazienti cirrotici.

### **Analisi di una casistica di pazienti con patologie reumatologiche**

Sono stati arruolati 40 pazienti di cui 17 affetti da AR, 11 da APs, 4 da PMR, 4 da sclerodermia e 4 da Sindrome di Sjogren.

Obiettivo del nostro lavoro è stato comprendere se esiste una correlazione tra i livelli plasmatici di Gas6 e le diverse malattie reumatologiche che abbiamo preso in esame.

Abbiamo quindi dosato la proteina in pazienti affetti da AR, APs, PMR, sclerodermia e sindrome di Sjogren. In seguito abbiamo eseguito l'analisi della varianza delle mediane delle concentrazioni plasmatiche di Gas6.

Non abbiamo osservato differenza statisticamente significative tra l'età mediana di ciascun gruppo (Test di Kruskal-Wallis,  $p=0.35$ ) pur evidenziando un'età mediana più elevata nei pazienti affetti da PMR, tale discrepanza è attribuibile alla scarsa numerosità del gruppo PMR. Vi è inoltre, come atteso, una maggiore proporzione di pazienti di sesso femminile per tutte le patologie considerate, tuttavia la distribuzione di frequenza del sesso femminile è analoga nei controlli ( $\chi^2$  n.s.). Non abbiamo rilevato alcuna correlazione fra i valori plasmatici di Gas6 e le patologie in esame. Infatti, suddivisi i pazienti in gruppi in base alla loro malattia e considerato anche un gruppo di soggetti sani, eseguendo l'analisi della varianza delle mediane (Test di Kruskal-Wallis) delle concentrazioni

plasmatiche di Gas6 di ogni gruppo abbiamo evidenziato che non esiste una differenza statisticamente significativa tra i vari gruppi ( $p > 0,05$ ) (Tabella 8).

DIAGNOSI	N <sup>0</sup> paz.	Età mediana	Sesso (M/F)	GAS6 (ng/ml)
AR	17	57,4±3,2	3 / 14	17,2 [16,0-18,7]
APs	11	57,2±4,5	3 / 8	16,6 [15,1-18,2]
PMR	4	78,2±1,6	1 / 3	15,5 [14,2-18,9]
Sclerodermia	4	65,6±3,2	0 / 4	16,8 [13,6-20,3]
S. Sjogren	4	60,5±2,4	0 / 4	17,9 [17,5-18,6]
Controlli	39	64,3±2,6	8 / 31	19,0[17,2-21,4]

**Tabella 8:** Mediana delle concentrazioni plasmatiche di Gas6 nei pazienti affetti da AR, Aps, PMR, sclerodermia e Sindrome di Sjogren e gruppo di controllo; tra parentesi i valori del range interquartile.

Abbiamo allora ipotizzato che i valori di Gas6 risultino non differenti dal gruppo di controllo a causa del fatto che molti dei pazienti non siano stati arruolati nella fase d'esordio della malattia. Perciò ci siamo proposti di valutare se ad eventuali variazioni dell'attività di malattia nel tempo corrisponda una variazione della concentrazione plasmatica di Gas6.

Per fare questo abbiamo valutato l'andamento della malattia nei pazienti affetti da AR e APs in un tempo di osservazione che è variato da un minimo di 4 mesi ad un massimo di 6 mesi, con una media di 5 mesi, servendoci di scale di valutazione internazionalmente validate ed utilizzate quali il DAS44, il DAS28 (calcolato sia con la VES che con la PCR), lo SDAI e lo CDAI, registrando i valori di laboratorio e somministrando l'HAQ.

Abbiamo quindi calcolato la regressione lineare tra la variazione della concentrazione del Gas6 al controllo rispetto all'inserimento e la variazione nel tempo degli indici clinici e di laboratorio da noi considerati (Tabella 9)

Non è emersa nessuna correlazione statisticamente significativa ( $p > 0,1$ ) tra le variazioni nel tempo della concentrazione plasmatica della proteina Gas6 e le variazioni degli indici clinici (Tabella 9).

<b>VARIABILI</b>	<b>r</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ DAS28 (VES)	0.09	0.01	n.s. (0.74)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ DAS28 (PCR)	-0.05	0.00	n.s. (0.85)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ DAS44	0.02	0.00	n.s. (0.95)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ SDAI	-0.01	0.00	n.s. (0.98)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ CDAI	-0.12	0.14	n.s. (0.66)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ HAQ	-0.13	0.02	n.s. (0.62)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ PCR	0.33	0.11	n.s. (0.21)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ VES	0.27	0.07	n.s. (0.32)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ articolazioni tumefatte	-0.29	0.08	n.s. (0.27)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ articolazioni dolenti	-0.12	0.01	n.s. (0.65)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ VAS medico	0.02	0.00	n.s. (0.92)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ VAS paziente	0.20	0.04	n.s. (0.45)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ VAS dolore	0.22	0.05	n.s. (0.40)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ morning stiffness	-0.10	0.01	n.s. (0.69)
$\Delta$ Gas6 vs $\Delta$ GH	-0.14	0.02	n.s. (0.59)

*Tabella 9:* variazione della concentrazione plasmatica della proteina Gas6 e variazione degli indici clinici e di laboratorio nel tempo di osservazione.

$\Delta$ =differenza tra variabile al controllo e variabile all'inserimento.

Si faccia riferimento anche ai grafici dal numero 1 al numero 15.

## **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 suo potenziale ruolo 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- $\alpha$ ), 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- $\gamma$ , 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)- $\kappa$ B, e i topi sono ipersensibili allo shock endotossico, al danno tissutale e alla morte dovuti al picco di TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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 $\kappa$ B), inibendo la liberazione di NF $\kappa$ B dal complesso con I $\kappa$ B e quindi inibendone la sua traslocazione nel nucleo con conseguente attivazione di trascrizione di geni di citochine proinfiammatorie tra cui il TNF- $\alpha$  (Sen et al., 2006).

Un altro studio ha invece evidenziato come l'espressione di Axl sia aumentata dalla stimolazione di monociti isolati con IFN- $\alpha$  e che il recettore Axl attivato determinerebbe l'espressione di Twist, un fattore di trascrizione che inibisce la trascrizione di TNF- $\alpha$  (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- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  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- $\alpha$ .

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- $\alpha$  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 Sonenberg, 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- $\alpha$  e IL-6, oltre ad IL-1 $\beta$ .

Gas6 riduce la secrezione di TNF- $\alpha$  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 $\beta$  è massimo (-35%) proprio a 48 ore.

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 e dalla presenza del recettore Mer non fosforilato e non di Axl anche nelle cellule non differenziate, seppur in percentuale minima (data not shown). L'assenza di Axl sulla superficie cellulare della linea U937 è stata provata anche da un recente studio che dimostra come esso sia espresso solo in seguito a stimolazione con IFN $\gamma$  (Sharif et al., 2006). 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- $\alpha$  in cellule dendritiche tramite Mer e una cascata di segnalazione

intracellulare attivata in conseguenza che viene ad interferire con la traslocazione di NFκB nel nucleo mediata dal sistema LPS/TLR. In particolare il segnale di Mer attiverrebbe PI3K/AKT che inibirebbe l'attivazione della IKK (chinasi di IκB) deputata alla liberazione di NFκB da un complesso di proteine inibitorie (IκB). In considerazione del fatto che la migrazione di NFκB 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).

Abbiamo quindi voluto verificare 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 si ha la fosforilazione di GSK3β 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 GSK3β influisce sull'associazione di NFκB 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 essi siano attivi 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 fosforilazione di Akt e GSK3β: 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 NFκB, 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.

Contrariamente a quanto atteso però non abbiamo potuto riscontrare un incremento statisticamente significativo della concentrazione di IL-10 e, in accordo con questo, non variano i livelli di attivazione di CREB, suo fattore di trascrizione. Possiamo pensare quindi che Gas6 non sia in grado di agire sul sistema di controllo della trascrizione/traduzione di IL-10 oppure, più probabilmente, che il legame di CBP a CREB sia già tendente ai massimi livelli e quindi che la secrezione di IL-10 non possa essere significativamente incrementata in seguito alla temporanea inibizione di NFκB mediata da Gas6.

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.,



2006) associati a elevazione dei valori di TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  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- $\alpha$ , e ciò rafforza la possibilità che la proteina eserciti un effetto modulatore sulla risposta immunitaria, ed abbia un significato anti-infiammatorio.

Ci siamo proposti inoltre di valutare l'espressione della proteina Gas6 nel liquor umano. Per questo motivo abbiamo dosato la concentrazione di tale proteina mediante metodo ELISA in soggetti con accertamenti neurologici negativi.

Abbiamo riscontrato che la proteina Gas6 è dosabile nel liquido cefalorachidiano alla concentrazione di 6,3 ng/ml. Tale concentrazione risulta stabile nei soggetti normali con range di variabilità molto ridotto ( $6,3 \pm 1,8$  ng/ml). Tale dato è originale, quindi non può essere confrontato con altri riscontri in letteratura.

Inoltre il valore di concentrazione misurato è inaspettatamente più elevato di quello che ci saremmo attesi sulla base della distribuzione liquorale delle altre proteine.

Prendendo a riferimento l'albumina che ha un peso molecolare di 69 kDa, molto vicino a quello della proteina di Gas6 (75kDa), che non è sintetizzata nel SNC ma la cui concentrazione liquorale dipende soltanto dalla ultrafiltrazione dei plessi corioidi, potremmo supporre, che entrambe dovrebbero attraversare la barriera ematoencefalica nello stesso modo. Essendo la concentrazione dell'albumina liquorale nell'uomo di 0.066-0.442 g/l e quella plasmatica di 35-55 g/l il rapporto tra albumina liquorale e plasmatica risulta di 1/100-1/500.

Ci saremmo aspettati anche per la proteina Gas6 un simile valore. In realtà il valore medio plasmatico della proteina Gas6 nei soggetti normali risulta da studi pubblicati e da nostri dati (Alciato et al., 2008; Balogh et al., 2005) di 18-19 ng/ml. Pertanto il rapporto tra la concentrazione media liquorale nei sani (6,3 ng/ml) e quella plasmatica (18-19 ng/ml) della proteina di Gas6 è di circa 1/3, ovvero decisamente superiore a quello atteso.

Considerando pertanto che la barriera ematoencefalica è scarsamente permeabile alle proteine (Francini e Losano, 1993) e la quota proteica liquorale deriva in parte da ultrafiltrazione del plasma, da trasporto attivo o sintesi intratecale (Daisenhammer et al., 2005; Monaco 2004; Francini e Losano, 1993) e considerando che la quota di ultrafiltrazione attesa per il Gas6 sulla base del comportamento dell'albumina è di circa 1/100 – 1/500, possiamo ipotizzare che la proteina Gas6 sia sintetizzata nel SNC o abbia un trasportatore attivo specifico. L'ipotesi che Gas6 sia sintetizzata in

sede intratecale è concorde con i dati di letteratura che evidenziano un'espressione del mRNA di Gas6 nel tessuto cerebrale di ratti e topi adulti e la funzione di Gas6 come fattore di sopravvivenza per diversi tipi neuronali e gliali (Prieto et al., 1999; Funakoshi et al., 2002; Li., et al., 1996).

È possibile quindi che Gas6 abbia un ruolo nel mantenere il trofismo di alcuni tessuti encefalici nell'uomo anche in condizioni di assenza di patologie neurologiche.

Abbiamo quindi confrontato i valori della concentrazione della proteina Gas6 nei vari soggetti affetti da varie patologie neurologiche sia non infiammatorie (Stroke, SLA, Cefalea, Epilessia) sia infiammatorie/autoimmuni (GBS, CIDP, altre polineuropatie infiammatorie autoimmuni, SM/CIS) riscontrando che i valori rimanevano pressoché invariati e sovrapponibili ai soggetti normali sia nei pazienti affetti da patologie neurologiche non infiammatorie sia infiammatorie eccetto che nei soggetti affetti da CIDP.

Infatti nei soggetti con CIDP il valore della concentrazione della proteina Gas6 era significativamente più elevato ([Gas6]= 10,8 +/- 2,5 ng/dl).

Abbiamo valutato se l'elevazione dei valori di Gas6 nei soggetti con CIDP fosse da imputare ad eventuali fattori confondenti quali la concentrazione delle proteine totali liquorali o l'età.

Infatti la concentrazione della proteina Gas6 potrebbe essere influenzata dalla variazione della concentrazione delle proteine totali liquorali per esempio per alterazione della permeabilità della barriera ematoencefalica.

È noto, inoltre, che il valore degli analiti liquorali varia nel corso degli anni, in particolare si osserva un moderato aumento della quota proteica (Daisenhammer et al., 2005). Pertanto risulta importante escludere che l'elevazione dei valori di Gas6 nei soggetti affetti da CIDP sia da imputare a questa causa, essendo tali soggetti in media, seppur non significativamente, più anziani.

Dall'analisi statistica eseguita emerge che Gas6 non è influenzato dalla concentrazione proteica liquorale. Infatti per prima cosa non esiste una differenza statisticamente significativa tra la concentrazione delle proteine liquorali tra i soggetti affetti da CIDP e GBS; pertanto pur essendoci una concentrazione delle proteine liquorali molto elevata e pressoché identica in queste due malattie, la concentrazione liquorale della proteina Gas6 è invece elevata nei pazienti con CIDP e sostanzialmente normale nella GBS. In secondo luogo non abbiamo evidenziato alcuna correlazione tra la concentrazione di Gas6 e le proteine totali liquorali in patologie non infiammatorie.

Sulla base di queste evidenze sperimentali possiamo concludere che la variazione della concentrazione della proteina Gas6 nei soggetti con CIDP non è influenzata dalla concentrazione delle proteine liquorali e pertanto non sembrerebbe dipendere da una variazione di permeabilità della membrana ematoencefalica.

Sulla base dei nostri risultati, inoltre, possiamo concludere con buona sicurezza che la concentrazione di Gas6 non è influenzata in modo determinante dall'età. Ciò risulta dal fatto che non abbiamo rilevato una differenza statisticamente significativa per questa variabile tra pazienti con CIDP e GBS o altre polineuropatie infiammatorie. Inoltre la correlazione tra la concentrazione di Gas6 ed età non è statisticamente significativa considerando i soggetti normali e quelli affetti da patologie non infiammatorie. Va certamente considerato che nel gruppo dei pazienti affetti da CIDP si è riscontrata un'età media (67,1+/- 16,4 anni) maggiore rispetto agli altri gruppi. Ciò è presumibilmente dovuto al fatto che l'incidenza di tale patologia è di norma più frequente nei soggetti ad un'età più avanzata.

Possiamo quindi concludere che sia l'età sia la concentrazione delle proteine totali liquorali non sono responsabili dell'elevazione della concentrazione di Gas6 nel liquor dei soggetti con CIDP.

In considerazione di quanto affermato sopra riguardo alla bassa probabilità che i risultati ottenuti siano influenzati da fattori confondenti, analizzeremo quindi i nostri risultati riguardo alla variazione della concentrazione liquorale della proteina Gas6 nelle varie patologie neurologiche esaminate.

Come descritto nei risultati abbiamo riscontrato una concentrazione liquorale della proteina Gas6 elevata solo nei pazienti affetti da CIDP.

Un'ipotesi riguardo alla rilevazione di elevati livelli di Gas6 nei pazienti con CIDP riguarda un suo possibile coinvolgimento diretto nella patogenesi del processo infiammatorio.

Recentemente sono infatti emerse alcune evidenze sperimentali riguardo ad un potenziale ruolo della proteina Gas6 nei processi infiammatori autoimmuni. Gas6 è risultato infatti inibire l'homing leucocitario in particolare dei granulociti dopo stimolo endoteliale (Avanzi et al., 1998). Inoltre, come detto in precedenza, i recenti studi su topi knockout per i recettori hanno mostrato che gli animali presentano iperattivazione linfocitaria, titoli elevati di autoanticorpi circolanti, manifestazioni tipo LES, Sjögren, AR e manifestazioni vasculitiche cutanee e del SNC (Lu e Lemke, 2001). Quindi da tali studi e dai nostri risultati emergerebbe un ruolo inibitorio della proteina Gas6 sull'attivazione macrofagica in particolare con controllo della secrezione di citochine proinfiammatorie come Tnf-alfa e IL-6.

La CIDP è una patologia cronica, demielinizzante, sostenuta da un'aggressione infiammatoria cronica di tipo cellulo-mediato. È stato infatti dimostrato in studi di campioni di biopsia del nervo di pazienti affetti da CIDP la presenza di linfociti T attivati con fenotipo eterogeneo, ovvero sia CD4 sia CD8 (Köller et al., 2005). Tali cellule T in tale sede esprimono citochine come TNF  $\alpha$ , interferone- $\gamma$ , e interleuchina-2 (Gold et al., 1999; Mathey et al., 1999). Inoltre è stato dimostrato che le cellule T attivano i macrofagi residenti endoneurali, che a loro volta rilasciano molecole

neurotossiche e potenzianti la reazione infiammatoria (i.e, radicali dell'ossigeno, metaboliti dell'ossido nitrico, metaboliti dell'acido arachidonico, proteasi, e componenti del complemento) (Kiefer et al., 2001; Hu et al., 2003) diretta contro la mielina o le cellule di Schwann. Nella CIDP i macrofagi servono anche come cellule presentanti l'antigene, come evidente dall'espressione di molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II e della molecola CD1a osservato nei campioni della biopsia del nervo di tali pazienti (Van Rhijn et al., 2000). Inoltre nel topo knock out per la molecola costimolatoria B7-2, essenziale per l'attivazione dei linfociti T helper da parte delle cellule presentanti l'antigene, si sviluppa una forma di neuropatia immunitaria spontanea del topo con somiglianze cliniche, elettrofisiologiche e morfologiche alla CIDP (Köller et al., 2005).

Di conseguenza in considerazione che la CIDP è una patologia cronica autoimmune con ipertattivazione linfocitaria policlonale e importante attivazione macrofagica possiamo ipotizzare che l'elevazione di Gas6 nel liquor di questi pazienti sia dipendente da una cronica attivazione infiammatoria macrofagica. Naturalmente tale ipotesi necessita di conferme sia istologiche (espressione di Gas6 nei macrofagi che infiltrano il tessuto nervoso in pazienti con CIDP) sia in modelli sperimentali murini (ruolo della proteina Gas6 in modelli sperimentali animali di neuropatie autoimmuni).

Il fatto che Gas6 non sia elevato invece nella GBS, altra patologia autoimmune con elevato componente infiammatoria, potrebbe dipendere dal fatto che tale patologia è acuta e presenta una patogenesi prevalentemente mediata dalla componente umorale dell'immunità. Infatti la sindrome di Guillain-Barrè non si automantiene se non in rari casi ed è stata dimostrato un ruolo patogenetico determinante di autoanticorpi anti nervo (Hughes et al., 2005). Infine la GBS risponde a terapia immunomodulanti quali Immunoglobuline e.v. e plasmateresi che intervengono principalmente nel controllare malattie con eccessiva funzione della componente umorale (Hughes et al., 2005).

Pertanto se si ipotizza che Gas6 sia coinvolto nei processi infiammatori autoimmuni che si automantengono, cioè cronicizzano è ragionevole che ciò non avvenga in una patologia acuta con iperattivazione della componente umorale dell'immunità e modesto coinvolgimento dei macrofagi come la GBS.

Per quanto riguarda invece il riscontro di valori normali di Gas6 nel gruppo delle altre neuropatie demielinizzanti infiammatorie non abbiamo dati sufficienti per formulare delle ipotesi patogenetiche sul ruolo della proteina Gas6 perché tale gruppo è risultato molto eterogeneo comprendendo neuropatie associate a malattie autoimmunitarie sistemiche, neuropatie miste assonali e demielinizzanti, neuropatie definite infiammatorie in pazienti con diabete o abuso alcolico, neuropatie ereditarie. Di conseguenza non potendo isolare sottogruppi con diagnosi definite e con sufficiente numerosità per l'analisi statistica non possiamo ne escludere ne confermare che Gas6

possa essere coinvolto nella patogenesi di altre polineuropatie infiammatorie croniche non rispondenti ai criteri di diagnosi della CIDP.

Infine ci siamo posti la domanda perché Gas6 non aumenta nei soggetti affetti da sclerosi multipla, nella quale è ben noto la presenza di un processo infiammatorio autoimmune demielinizzante.

Ovviamente tale patologia è sostenuta da eventi infiammatori interessanti la mielina del SNC (oligodendrociti) e non del sistema nervoso periferico (cellule di Schwann). Tuttavia evidenze sperimentali hanno riscontrato un ruolo della proteina Gas6 anche come fattore di sopravvivenza e di crescita per gli oligodendrociti. Pertanto ci saremmo attesi una variazione di concentrazione di Gas6 nel liquor dei pazienti affetti da tale patologia.

In primo luogo è possibile che non sia stata riscontrata una variazione di Gas6 in quanto la manovra di rachicentesi diagnostica è stata eseguita durante il ricovero ospedaliero di pazienti che presentavano nella maggioranza dei casi un primo evento demielinizzante-CIS. Tali eventi sono in genere caratterizzati da un infiltrato infiammatorio localizzato e di modesta entità e successiva completa restitutio ad integrum (Miller et al., 2005). La reazione infiammatoria in questi casi, infatti, si auto-limita, determinando la regressione del processo infiammatorio e del danno mielinico. Perciò se in queste forme la componente infiammatoria è scarsa e il danno demielinizzante è modesto è ragionevole ipotizzare che ci sia uno scarso stimolo per la proteina Gas6 sia come fattore coinvolto nella riparazione della mielina sia come molecola del network infiammatorio. Inoltre, nessuno dei soggetti appartenenti a questo gruppo era affetto da una forma progressiva primaria o secondaria di SM, forme in cui la componente infiammatoria cronica e il danno mielinico sono di entità notevolmente superiori.

Quindi possiamo confermare che nelle CIS non c'è un aumento di Gas6 dovuto probabilmente alle ipotesi sopracitate ma non possiamo escludere che ci possa essere un aumento della concentrazione liquorale della proteina Gas6 nelle forme progressive di sclerosi multipla. Ci proponiamo di testare in futuro questa ipotesi.

Abbiamo poi dimostrato che le concentrazioni di Gas6 nella popolazione affetta da epatopatia cronica studiata sono nettamente più elevate rispetto al riferimento nella popolazione generale e che i valori riscontrati crescono al crescere della severità di malattia epatica così che in caso di cirrosi si rilevano concentrazioni significativamente più elevate rispetto alle forme caratterizzate da modesta o minima fibrosi.

Inoltre nella popolazione in studio non abbiamo rilevato differenze significative delle concentrazioni di Gas6 in rapporto a una serie di variabili demografiche e cliniche, come ad

esempio l'età. Infine tra i soggetti affetti da cirrosi le concentrazioni più alte sono state riscontrate nei casi in cui sono già presenti complicanze, riferibili a ipertensione portale (ascite)

Si può dunque affermare che i risultati del dosaggio del Gas6 nel sangue di pazienti con epatopatia cronica hanno documentato chiaramente come, al progredire della malattia epatica, quando cioè la massa di epatociti nel fegato ovviamente cala, la concentrazione di Gas6 nel sangue aumenta. Lo sviluppo di epatocarcinoma non ne determina un ulteriore aumento, indicando che, probabilmente, non vi è produzione di tipo paraneoplastico di questa proteina e che la concentrazione di Gas6 può essere un potenziale marker sierologico di fibrosi ma non può esserlo dell'epatocarcinoma.

Non essendo ancora del tutto chiari i meccanismi di clearance del Gas6 circolante, si potrebbe obiettare che i valori di Gas6 possono essere anche legati a riduzione dei processi di degradazione e di eliminazione proteica. A questo proposito, il dosaggio eseguito simultaneamente sia su sangue periferico sia su sangue delle vene sovraepatiche ha mostrato in quest'ultimo maggiori concentrazioni ematiche. Possiamo pertanto affermare che l'effetto netto del passaggio di sangue attraverso il fegato è l'arricchimento di Gas6, non il contrario. Gli esperimenti in vitro danno supporto all'ipotesi che il Gas6 rilevato nel sangue periferico di pazienti cirrotici in concentrazione aumentata rispetto al riferimento normale, e con un gradiente a decrescere tra sangue refluo dalle vene sovraepatiche e vene periferiche, possa, in buona misura, derivare dalle cellule stellate. Infatti ciò che certamente aumenta al progredire della malattia epatica è la quantità di cellule stellate attivate.

Nell'ultima parte del nostro studio ci siamo proposti di indagare le possibili variazioni della concentrazione plasmatica di Gas6 in pazienti affetti da malattie autoimmuni ipotizzando il suo coinvolgimento in questi processi patologici e la sua eventuale utilità nella valutazione clinica e prognostica. Per fare ciò abbiamo arruolato 40 pazienti tra quelli seguiti presso l'ambulatorio immuno-reumatologico del nostro ospedale e abbiamo dosato le concentrazioni plasmatiche di Gas6 con metodica E.L.I.S.A.

L'obiettivo del nostro lavoro è stato comprendere se esiste una correlazione tra i livelli plasmatici di Gas6 e le diverse malattie autoimmuni prese in esame. Abbiamo quindi dosato la proteina in pazienti affetti da artrite reumatoide, artrite psoriasica, polimialgia reumatica, sclerodermia, sindrome di Sjogren.

Non abbiamo rilevato alcuna correlazione fra i valori plasmatici di Gas6 e la patologia in esame. Infatti, suddivisi i pazienti in gruppi in base alla loro malattia e considerato anche un gruppo di soggetti sani, analizzando le rispettive concentrazioni plasmatiche abbiamo evidenziato che non esiste una differenza statisticamente significativa tra i vari gruppi.

Questo risultato si può spiegare in diversi modi. In primo luogo Gas6 potrebbe non essere coinvolto nelle malattie infiammatorie articolari. Gli studi sui topi knockout di cui abbiamo parlato e che mostravano lo sviluppo di patologie autoimmuni come l'AR, il lupus eritematoso sistemico, la sindrome di Sjogren e il pemfigo volgare nei knock out, coinvolgevano infatti i recettori Axl, Mer e Tyro3 e non direttamente la proteina Gas6. La correlazione tra l'effetto della presenza/assenza dei recettori e la funzione di una proteina non è strettamente lineare, poiché intervengono diversi meccanismi. Ad esempio l'assenza dei recettori per Gas6 sulla membrana plasmatica può far sì che vengano legate altre proteine di superficie le quali a loro volta possono mediare delle reazioni responsabili degli effetti evidenziati nei topi mutati, che perciò in realtà potrebbero non essere dovute al mancato compimento della funzione di Gas6, o almeno non direttamente. Oppure la delezione recettoriale potrebbe essere sostituita da altre molecole di segnale svolgenti funzioni differenti. Naturalmente tali ipotesi potrebbero essere confutate valutandole in un modello sperimentale con la delezione del gene *gas6*.

Oppure Gas6 potrebbe essere coinvolto fisiopatologicamente ma la sua concentrazione plasmatica non varia sensibilmente a causa del fatto che spesso Gas6 è secreta in modo autocrino dalle stesse cellule che possiedono i suoi recettori in superficie; inoltre Gas6 possiede una sequenza che lega il calcio e le membrane cellulari: questo dominio potrebbe catalizzare la reazione ligando-recettore permettendo a Gas6 di legarsi alla superficie delle cellule raggiungendo concentrazioni locali intorno ai recettori molto elevate non influenzando grossolanamente la concentrazione plasmatica.

Una terza possibilità è che Gas6 si trovi elevato solo nel liquido sinoviale. O'Donnell et al, in un studio del 1999, avevano valutato i livelli di Gas6 nel liquido sinoviale e nel plasma di pazienti affetti da AR utilizzando la tecnica Western Blotting, osservando livelli elevati della proteina nel liquido e nella membrana sinoviale ed una sua totale assenza nel plasma. Avevano ipotizzando quindi o una produzione di Gas6 strettamente localizzata all'articolazione oppure una alterazione della sua emivita all'interno di essa. Per valutare la presenza di Gas6 in quello studio è stata usata una metodica la cui risoluzione è meno accurata rispetto alla tecnica E.L.I.S.A. messa a punto nel nostro laboratorio, che infatti ci ha permesso di evidenziare la presenza di Gas6 anche nel plasma dei nostri pazienti. Questo fatto ci può far pensare che se avessimo dosato il livello di Gas6 nel liquido sinoviale dei pazienti affetti da AR con la tecnica E.L.I.S.A. avremmo trovato dei valori significativamente elevati e che, invece, la concentrazione plasmatica non sia influenzata da questo meccanismo che risulterebbe quindi strettamente localizzato.

In ultima ipotesi il risultato da noi ottenuto potrebbe essere dovuto al fatto che molti dei pazienti inclusi nel nostro studio non sono stati arruolati nella fase d'esordio della malattia, anzi molti erano

già in terapia da diverso tempo. Per questo alcuni dei pazienti inclusi nello studio presentavano in realtà una attività di malattia stabile, come è stato evidenziato dal fatto che hanno presentato solo lievi variazioni nel punteggio delle scale cliniche da noi adottate per controllare nel tempo l'andamento dell'attività di malattia.

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 $\beta$  tramite Akt e con conseguente inibizione del fattore di trascrizione NF $\kappa$ B.

Inoltre abbiamo dimostrato che la proteina Gas6 è coinvolta in molte patologie su base infiammatoria poiché la sua concentrazione risulta elevata nel liquor di pazienti affetti da CIDP e nel plasma di pazienti con infezione polmonare o con epatopatia cronica. Non tutte le condizioni infiammatorie però prevedono un aumento sistemico della concentrazione di Gas6, tanto che i pazienti affetti da artropatie autoimmuni hanno una concentrazione plasmatica di Gas6 paragonabile ai soggetti sani, mentre la proteina risulta concentrarsi nei siti articolari infiammati (O'Donnell et al., 1999).



## **BIBLIOGRAFIA**

- Alciato F., Sainaghi P.P., Castello L., Bergamasco L., Carnieletto S., Avanzi G.C. 2008; *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. 29(2):167-80
- Andorfer B, Kieseier BC, Mathey E, et al. 2001. *Expression and distribution of transcription factor NF-kB and inhibitor Ikb in the inflamed peripheral nervous system.* J Neuroimmunol 116:226-32.
- 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.
- Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahhlbäck B. 2005. *Analysis of Gas6 in human platelets and plasma.* Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology 25:1-7.
- Bautista, A. P., A. Schuler, Z. Spolarics, and J. J. Spitzer. 1991. *Tumour necrosis factor- $\alpha$  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.
- Bergamini L, Bergamasco B, Mutani R. 2001. *Manuale di neurologia clinica.* Edizioni libreria cortina. Terza edizione, cap. 11, cap 20.
- 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.
- Cassell S, Kavanaugh A. 2005 *Psoriatic arthritis: pathogenesis and novel immunomodulatory approaches to treatment.* J Immune Based Ther Vaccines;3:6.
- 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.
- Christ M, Laule K, Klima T, et al. 2008 *Multimarker strategy for risk prediction in patients presenting with acute dyspnea to the emergency department.* Int J Cardiol;126:73e8.
- 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<sup>l</sup>, 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.
- Costello P, Bresnihan B, O'Farrelly C, FitzGerald O. 1999 *Predominance of CD8+ T lymphocytes in psoriatic arthritis.* J Rheumatol;26:1117–24.
- Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus N.E, Giovannoni G, Rauer S, Sellebjerg.F. 2005. *Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force*
- 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.
- Ernest H.S. Choy, Gabriel S. Panayi. 2001 *Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis.* N Engl J Med; 344(12):907-16.
- 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.
- Francini F. Losano G. 1993. *Elementi di fisiologia dell'uomo.* UTET. Seconda edizione. Cap 11.1.
- Frank, M. M., L. F. Fries. 1991. *The role of complement in inflammation and phagocytosis.* Immunol. Today 12: 322–331.
- Fraser A, Fearon U, Billingham RC, Ionescu M, Reece R, Barwick T, et al. 2003 *Turnover of type II collagen and aggrecan in cartilage matrix at the onset of inflammatory arthritis in humans: relationship to mediators of systemic and local inflammation.* Arthritis Rheum;48:3085–95.

- 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.
- Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, Matumoto K, Nakamura T. 2002. *Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons*. Journal of neuroscience Research 68: 150-160.
- 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.
- Gallicchio 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.
- Gibot S, Massin F, Cravoisy A, et al. 2007 *Growth arrest-specific protein 6 plasma concentrations during septic shock*. Crit Care;11:R8.
- Gladman DD, Shuckett R, Russell ML, Thorne JC, Schachter RK. 1987 *Psoriatic arthritis (PSA): an analysis of 220 patients*. Q J Med;62:127–41.
- 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.
- Gold R, Archelos JJ, Hartung HP. 1999. *Mechanisms of immune regulation in the peripheral nervous system*. Brain Pathol 9: 343-60
- 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.
- Graudal N, Tarp U, Jurik AG, Galloe AM, Garred P, Milman N, et al. 2000. *Inflammatory patterns in rheumatoid arthritis estimated by the number of swollen and tender joints, the erythrocyte sedimentation rate, and hemoglobin: Long term course and association to radiographic progression*. J Rheumatol 27(1):47–57.
- Gravallese EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, et al. 2000 *Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor*. Arthritis Rheum; 43: 250-8.
- Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. 2007 *Biomarkers of hepatic fibrosis, fibrogenesis and genetic pre-disposition pending between fiction and reality*. J Cell Mol Med.;11(5):1031-51.
- 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.
- Harris ED Jr *Rheumatoid arthritis: pathophysiology and implications for therapy.* N Eng J Med 1990; 322: 1277-1289
- 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.
- Hochberg MC *Adult and juvenile rheumatoid arthritis: current epidemiologic concepts.* Epidemiol Rev 1981; 3:27-44
- Holmes S., Friese M.A., Siebold C, Jones EY., Bell J. and Fugger L. 2005. *The pathogenesis of multiple sclerosis (MS) and points of therapeutic intervention.* Expert Reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Press.
- Horwood NJ, Kartsogiannis V, Quinn JM, Romas E, Martin TJ, Gillespie MT. 1999 *Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro* Biochem Biophys Res Commun; 265: 144-50.
- Hu W, Mathey E, Hartung HP, Kieseier BC. 2003. *Cyclo-oxygenases and prostaglandins in acute inflammatory demyelination of the peripheral nerve.* Neurology 61:1774-9.
- 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
- Hughes R.C. Comblath D.2005. *Guillain-Barré syndrome.* Lancet. 366: 1653-1666.
- Isler P, Vey E, Zhang JH, Dayer JM. 1993 *Cell surface glycoproteins expressed on activated human T cells induce production of interleukin-1 beta by monocytic cells: A possible role of CD69.* European Cytokine Network; 4: 15-23.
- Jacobs BC, Rothbarth PH, van der Meché FGA, Herbrink P et al. 1998. *The spectrum of antecedent infections in Guillain Barré syndrome. A case-control study.* Neurology 51:1110–1115
- 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.

- Kanda T, Numata Y, Mizusawa H. 2004. *Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1*. J Neurol Neurosurg Psychiatry 75:765-9.
- Kastenbauer S, Koedel U, Wick M, Kieseier BC, Hartung HP, Pfister HW. 2003. *CSF and serum levels of soluble fractalkine (CX3CL1) in inflammatory diseases of the nervous system*. J Neuroimmunol 137: 210-7.
- Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP. 2001. *The role of macrophages in immunemediated damage to the peripheral nervous system*. Prog Neurobiol 64:109-27.
- Kieseier BC, Clements JM, Pischel HB, et al. 1998. *Matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-7 are expressed in experimental autoimmune neuritis and the Guillain-Barre syndrome*. Ann Neurol 43:427-34.
- Kissel JT, Mendell JR. 1992. *Vasculitic neuropathy*. Neurol Clin. 10(3):761-81
- Köller H, Bernd C, Kieseier B.C, Jander S, Hartung H.P. 2005. *Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropath*. N Engl J Med 352:1343-56
- Kuwabara S. 2004. *Guillain-Barre syndrome: epidemiology, pathophysiology and management*. Drugs. 64(6):597-610
- Lafdil F, Chobert MN, Couchie D, et al. 2006; *Induction of Gas6 protein in CCl4-induced rat liver injury and anti-apoptotic effect on hepatic stellate cells*. Hepatology. 44(1):228-39.
- 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. *Lipopolysaccharidestimulated TNF- $\alpha$  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; 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.;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
- Mathey EK, Pollard JD, Armati PJ. 1999. *TNF alpha, IFN gamma and IL-2 mRNA expression in CIDP sural nerve biopsies.* J Neurol Sci 163:47-52.
- 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.
- McCaughan G.W., George J. 2004. *Fibrosis progression in chronic hepatitis C virus infection.* Gut.;53:318-321
- Meier T, Meyer M. 1990. *Peripheral neuropathy with monoclonal gammopathy.* Schweiz Med Wochenschr. Mar 24;120(12):417-25
- 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.;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
- Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. 2005. *Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis.* Lancet neurol 4:281-288.
- Minta JO., Panbrun L., 1985. *In vitro induction of cytologic and functional differentiation of the immature human monocytelike cell line U-937 with PMA.* Amj. Pathol. 119(1):111-26.
- Monaco F. 2004. *Neurologia.Manuale di apprendimento.* Centro scientifico editore. Cap.7 parte seconda, cap 1 patre terza.
- 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;270(11):5702-5.

- Mottonen T, Paimela L, Leirisalo-Repo M, Kautiainen H, Ilonen J, Hannonen P. 1998 *Only high disease activity and positive rheumatoid factor indicate poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis treated with "sawtooth" strategy.* Ann Rheum Dis;57:533–9.
- 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.;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.;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.;25(1-2):91-6.
- Nobile E, Terenghi F, Bersano A. 2004. *Patogenesi delle neuropatie disimmuni.* Neurol Sci 25: 137-143
- 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.;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 816(2):646-61.
- Prieto AL, O'Dell S., Varnum B., Lai C. 2007. *Lai C Localization and signaling of the receptor protein tyrosine kinase Tyro3 in cortical and hippocampal neurons.* Neuroscience 150:319–334.

- Quattrini A, Previtali SC, Kieseier BC, Kiefer R, Comi G, Hartung HP. 2003. *Autoimmunity in the peripheral nervous system*. Crit Rev Neurobiol 15:1-39.
- 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.
- Ritchlin C, Haas-Smith SA, Hicks D, Cappuccio J, Osterland CK, Looney RJ. 1998 *Patterns of cytokine production in psoriatic synovium*. J Rheumatol;25:1544–52
- Roitt, I. M. 1994. *Immunity to infection*, p. 243–271. In I. M. Roitt (ed.), *Essential immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
- Sainaghi PP, Collimedaglia L, Alciato F, Leone MA, Puta E, Naldi P, Castello L, Monaco F, Avanzi GC. 2008 *Elevation of Gas6 protein concentration in cerebrospinal fluid of patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP)*. J Neurol Sci.;269(1-2):138-42.
- 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;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. 2007. *Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF- $\kappa$ B activation in dendritic cells*. Blood. 15;109(2):653-60
- 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.
- Stein PD, Woodard PK, Weg JG, et al. 2006 *Diagnostic pathways in acute pulmonary embolism: recommendations of the PIOPED II investigators*. Am J Med;119:1048e55.
- Stevens A. Lowe J.S. 1999. *Istologia umana*. Casa editrice ambrosiana, seconda edizione, cap. 6
- 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;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. 2002. *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. 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.
- Valesini G, Barone F, Bompane D, Catuogno M, Sili Scavalli A. 2004 *Advances in immunology and rheumatoid arthritis pathogenesis*. Reumatismo;56-N.1(Suppl.1):9-20
- van den Berg WB. 2001. *Uncoupling of inflammatory and destructive mechanisms in arthritis*. Semin Arthritis Rheum 30(5 Suppl 2):7–16.
- Van Rhijn I, Van den Berg LH, Bosboom WM, Otten HG, Logtenberg T. 2000. *Expression of accessory molecules for T-cell activation in peripheral nerve of patients with CIDP and vasculitic neuropathy*. Brain 123: 2020-9.
- 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; 373(6515):623-6.
- Vasey FB, Deitz C, Fenske NA, Germain BF, Espinoza LR. 1982 *Possible involvement of group A streptococci in the pathogenesis of psoriatic arthritis*. J Rheumatol;9:719–22.
- Veale D, Yanni G, Rogers S, Barnes L, Bresnihan B, FitzGerald O. 1993 *Reduced synovial membrane macrophage numbers, ELAM-1 expression, and lining layer hyperplasia in psoriatic arthritis as compared with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum;36: 893–900.
- Veale DJ, Ritchlin C, FitzGerald O. 2005 *Immunopathology of psoriasis and psoriatic arthritis*. Ann Rheum Dis;64 Suppl 2:ii26–9.
- 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 apoB-containing 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.

Wright V, Moll JMH. Psoriatic arthritis. In: Wright V, Moll JMH, eds. Seronegative polyarthritis. Amsterdam: North Holland Publishing Co, 1976:169–223.

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.;276(45):42364-9.

Yanagita M, Arai H, Ishii K, et al. 2001; *Gas6 regulates mesangial cell proliferation through Axl in experimental glomerulonephritis*. Am J Pathol. 158(4):1423-32.

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.;110(2):239-46.

Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Rimura T. 2000 *Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2 balance ad disease severity in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheumatism; 43: 617-27.