

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



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

TESI DI DOTTORATO

TITOLO:

**Ruolo della proteina Gas6 come inibitrice
della neo-angiogenesi tumorale e nelle malattie
infiammatorie demielinizzanti del sistema nervoso.**

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

Alla mia dolce e meravigliosa Laura

Ai miei genitori

Indice

GAS6	Pag. 3
PARTE I : Ruolo della proteina Gas6 come inibitrice della neo-angiogenesi tumorale	
INTRODUZIONE	
➤ ANGIOGENESI	Pag. 7
➤ ANGIOGENESI : MECCANISMI	Pag. 9
➤ VEGF	Pag. 17
➤ ANGIOGENESI TUMORALE	Pag. 24
➤ INIBIZIONE DELL' ANGIOGENESI TUMORALE	Pag. 29
➤ GAS6 E ANGIOGENESI	Pag. 31
➤ MODELLI DI STUDIO DELL' ANGIOGENESI	Pag. 34
SCOPO DEL LAVORO	Pag. 38
MATERIALI E METODI	Pag. 40
RISULTATI	Pag. 51
DISCUSSIONE	Pag. 68
PARTE II: Ruolo della proteina Gas6 nelle malattie infiammatorie demielinizzanti del sistema nervoso.	
INTRODUZIONE	
➤ MALATTIE INFIAMMATORIE DEMIELINIZZANTI DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE, SCLEROSI MULTIPLA.	Pag. 75
➤ MALATTIE INFIAMMATORIE DEMIELINIZZANTI DEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO, SINDROME DI GUILLAIN BARRÉ (GBS) E CIDP (CHRONIC INFLAMMATORY DEMYELINATING POLYNEUROPATHY)	Pag. 80
➤ GAS6 E INFIAMMAZIONE	Pag. 90
➤ GAS6 E MALATTIE INFIAMMATORIE DEMIELINIZZANTI DEL SISTEMA NERVOSO	Pag. 95
SCOPO DEL LAVORO	Pag. 98
PAZIENTI, MATERIALI E METODI	Pag. 100
RISULTATI	Pag. 106
DISCUSSIONE	Pag. 116
BIBLIOGRAFIA	Pag. 124

GAS6 (Growth Arrest Specific Gene 6)

Il gene Gas6 (Figura 1) è stato identificato e clonato nel 1988 insieme ad altri 5 geni caratterizzati dall'essere espressi durante la fase G₀ del ciclo cellulare in fibroblasti murini. Per tale ragione venne denominato Growth Arrest Specific Gene 6 (Gas6) (Schneider C et al., 1988).

Clonato quindi nell'uomo nel 1993, si compone di 2556 nucleotidi e codifica per una proteina secreta (Manfioletti G et al., 1993).

Il mRNA di Gas6 è stato individuato in vari tessuti murini (cuore, polmone, epitelio gastrico, rene, SNC, cellule del Sertoli e del Leydig) e nei cheratinociti (Lu Q et al., 1999; Mark MR et al., 1994; Prieto AL et al., 1999) mentre la proteina è stata osservata nelle cellule endoteliali (Avanzi G et al., 1998; O'Donnel K et al., 1999), cellule del Sertoli, cellule del Leydig (Lu Q et al., 1999), VSMCs (Vascular Smooth Muscle Cells) (Nakano T et al., 1995) e diffusamente nel SNC (cellule di Purkinje, cellule piramidali della neocortex, cellule della corteccia del giro piriforme, dell'ippocampo, del talamo, dell'ipotalamo e dei nuclei trigeminali) (Prieto AL et al., 1999).

Nell'uomo l'mRNA di Gas6 è presente in vari tessuti quali il polmone, epitelio intestinale, midollo osseo, cellule endoteliali (Manfioletti G et al., 1993); come proteina è stata individuata nell'endotelio, nelle HUVECs (Humbelical Vein Endotelial Cells), nelle VSMCs, nel tessuto ematopoietico (stroma midollare, precursori ematopoietici), nelle piastrine e nei fibroblasti (Avanzi G et al., 1997; Manfioletti G et al., 1993; Melaragno MG et al., 1998; O'Donnell K et al., 1999).

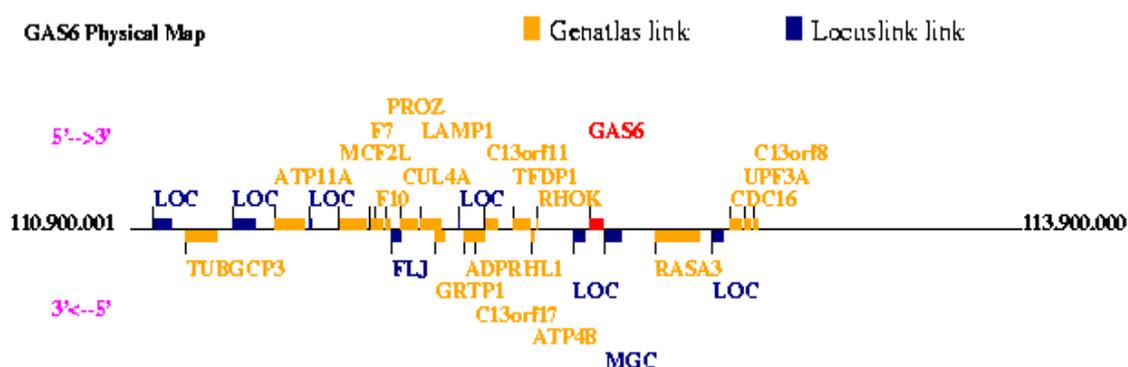


Figura 1. La figura illustra la mappa fisica del gene Gas6.

Studi ultrastrutturali hanno dimostrato che Gas6 è una proteina multimodulare costituita da un dominio γ -carbossiglutamminico N-terminale, varie sequenze ripetute EGF-like e un doppio dominio globulare carbossi-terminale. Per la sua attività è necessaria la γ -carbossilazione dei residui di acido glutammico dei domini globulari carbossi-terminali mediata dalla vitamina K e presenta analogie (identità al 44%) di sequenza con la proteina S e in minor percentuale con una proteina coinvolta nel trasporto degli ormoni steroidei, la SHBG (Sex Hormones Binding Globulin) (Joseph DR et al., 1997; Manfioletti G et al., 1993).

Il fatto che questa proteina fosse espressa durante la fase di quiescenza della cellula, ha fatto inizialmente supporre che il suo ruolo potesse essere legato alla regolazione della proliferazione e/o della sopravvivenza cellulari (Schenider C et al., 1978).

È stato dimostrato che Gas6 in vitro induce la proliferazione e promuove la sopravvivenza di fibroblasti murini della linea NIH-3T3 (Gruppi S et al., 1996) e li protegge dall'apoptosi indotta dalla deprivazione di siero o di aggiunta di TNF- α (Bellosta P 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 YWC et al., 1998; Nakano T et al., 1997), ed infine induce la proliferazione e protegge dall'apoptosi le cellule di Schwann (Li R 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 G et al., 1997). Ha inoltre effetto mitogeno su alcune linee cellulari metastatizzanti di carcinoma di prostata (Sainaghi PP et al., 2005).

Protegge dall'apoptosi le cellule HUVEC umane (Human Umbelical Vein Endotelian Cells) in vitro, sia deprivate dei fattori di crescita sia pretrattate con TNF- α . Tale effetto è evocato con l'aggiunta esogena di Gas6 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 MG et al., 1998). Un'azione antiapoptotica di Gas6 è stata anche descritta nei confronti dei neuroni secernenti GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) (Allen MP et al., 1999; Allen MP et al., 2002).

Gas6 lega con differente affinità, i membri di una famiglia di recettori tirosina chinasi (RTKs). Questa famiglia (di Tyro3) comprende: Tyro3 (denominato anche Rse, Sky, Brt, Tif o Dtk (Godowski PJ et al., 1995), Axl (altresì chiamato Ark, Ufo e Tyro7 (Stitt TN et al., 1995; Varnum B et al., 1995) e Mer (chiamato anche Eyk, Nyk e Tyro12) (Chen J et al., 1997).

Axl, isolato nel 1991 (Janssen JW et al., 1991; O'Bryan JP et al., 1991), è il recettore nei confronti del quale Gas6 ha maggiore affinità (Kd= 0,4 nM) (Nagata et al., 1996), ed è presente nel tessuto emopoietico normale e neoplastico: è espresso nei progenitori emopoietici CD34⁺ e nelle cellule stromali midollari, in cellule endoteliali, fibroblasti, condrociti, VSMCs e nei monociti, mentre

manca nei linfociti e nei granulociti (Allen MP et al., 1999; Fridell YWC et al., 1998; O'Bryan JP et al., 1991; Neubauer A et al., 1994). Inoltre l'mRNA di Axl è stato identificato overespresso in cellule neoplastiche di alcune malattie oncoematologiche come la leucemia mieloblastica acuta, nella leucemia mieloide cronica ma non nei disordini linfoproliferativi (Neubauer A et al., 1994); è altresì stato individuato in linee cellulari di carcinoma del colon (Craven RJ et al., 1995), epatocellulare (Janssen JW et al., 1991), carcinoma papillare ed anaplastico della tiroide (Ito T et al., 1999). Tyro3 è espresso soprattutto a livello cerebrale (Mark MR et al., 1996; Prieto AL et al., 1999), mentre 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).

Queste molecole presentano una struttura extracitoplasmatica costituita da due domini tipo immunoglobulina seguiti da due domini tipo fibronectina III, simile a quella presente in molte molecole di adesione (O'Bryan et al., 1991; Graham DK et al., 1994; Ito T et al., 1999; Neubauer A et al., 1994).

È stata evidenziata l'abilità del recettore murino analogo di Axl, denominato Ark, di mediare l'aggregazione cellulare grazie ad un legame omofilico/omotipico (Bellosta P et al., 1995).

Successivamente, è stato dimostrato che anche in una linea cellulare megacariocitaria 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, facendo supporre che questo fenomeno sia mediato dalla interazione tra le diverse molecole di recettori Axl presenti sulla superficie cellulare (Avanzi G 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 G 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 stimolata del fattore di attivazione piastrinica (PAF), dalla trombina, dall'interleuchina 1 β (IL-1 β), dal fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α), e dal forbolo 12-miristilato 13-acetato (PMA) e che un ligando solubile di Gas6, Axl-X, potenzia l'adesione dei PMN all'endotelio inattivo (Avanzi G et al., 1998). Di contro, la proteina Gas6 non influenza l'adesione dei PMN all'endotelio inattivo o stimolato da n-formilmethionil-leucifenilalanina (FMLP) e da interleuchina-8 (IL-8) (Avanzi G et al., 1998). Gas6 è quindi una molecola antiadesiva che agisce prevalentemente sull'endotelio.

Negli ultimi anni sono state studiate altre funzioni di Gas6 ad indicare la complessità dei ruoli attribuiti alla stessa proteina. Tra questi si può ricordare il ruolo della proteina Gas6 nella proliferazione mesangiale, indispensabile nella patogenesi del danno glomerulare. Infatti è stato

dimostrato che la proteina 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 M 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 M et al., 2002); inoltre, più recentemente, è stato individuato il ruolo della proteina nell'ipertrofia glomerulare in stati precoci di nefropatia diabetica (Nagai K et al., 2003).

Più recentemente è stato approfondito il ruolo del Gas6 nell'emostasi. In questo senso, pare abbiano un ruolo preminente i recettori Axl e Tyro3/Rse. La proteina Gas6 interviene nell'aggregazione piastrinica e nella formazione del trombo. Infatti l'inattivazione del gene Gas6 nel topo knock-out (Gas6^{-/-}) previene la trombosi venosa e la tromboembolia polmonare rappresentando un fattore protettivo dall'induzione della tromboembolia da infusione di collagene/epinefrina, fatale nei topi wild type. Tale effetto protettivo è riproducibile nel topo wild type mediante la somministrazione di anticorpo anti Gas6. Tale fenomeno è stato confermato anche nei topi knock-out per i recettori tirosin-chinasici di Gas6, infatti la mancanza di tutti i recettori o anche di uno solo di essi comporta i medesimi effetti protettivi descritti per l'inattivazione del ligando. L'emostasi di tali animali tuttavia non è compromessa, non sono stati infatti osservati sanguinamenti spontanei nei topi Gas6^{-/-}. La proteina Gas6 sembrerebbe quindi intervenire nella stabilizzazione e non nella formazione del trombo piastrinico rappresentando probabilmente un segnale di amplificazione dell'aggregazione piastrinica (Angelillo-Sherrer A et al., 2001; Angelillo-Sherrer A et al., 2005). La mancata espressione dei recettori Axl, Tyro3 e Mer in topi knockout per i medesimi recettori, è stata correlata all'infertilità causata dalla morte progressiva delle cellule germinali in differenziazione (Lu Q et al., 1999).

Recenti evidenze hanno posto in evidenza effetti della proteina Gas6 nel processo angiogenetico e hanno correlato la proteina Gas6 con la regolazione di cellule dell'immunità innata e con la regolazione e la riparazione di processi infiammatori cronici del sistema nervoso centrale.

La correlazione tra Gas6 e l'angiogenesi fisiologica e patologica sarà approfondita nella prima parte del presente studio mentre la correlazione tra la proteina Gas6 e i processi infiammatori del sistema nervoso nella seconda parte.

PARTE I

Ruolo della proteina Gas6 come inibitrice della neo-angiogenesi tumorale

ANGIOGENESI

La formazione della rete vascolare è un evento precoce nello sviluppo embrionale e rappresenta il presupposto necessario per l'apporto di ossigeno e nutrienti ai tessuti in fase di sviluppo e crescita (Folkman J, Klagsburn M, 1987).

Il processo ha inizio con la vasculogenesi: le cellule endoteliali differenziano dall'emangioblasto che è il precursore comune della linea emopoietica ed endoteliale. Le cellule endoteliali, stimolate dall'interazione tra il VEGF ed il suo recettore VEGFR-2, proliferano all'interno del mesoderma e aderiscono tra loro a formare una primitiva rete di tubuli. Con il procedere della differenziazione si formano i principali vasi arteriosi e venosi (aorta e grandi vene) uniti tra loro da plessi vascolari a nido d'ape. La vasculogenesi termina in questa fase. Il successivo sviluppo della rete vascolare viene definito angiogenesi e si articola in due processi distinti; il rimodellamento angiogenico (angiogenic remodelling) e la gemmazione angiogenica (angiogenic sprouting) (Risau W, 1997).

Il rimodellamento angiogenico interviene sulla primitiva rete vascolare formata nel processo di vasculogenesi e porta alla formazione di una rete caratterizzata da ramificazioni ben organizzate di vasi con cellule endoteliali in continuità tra loro e ben adese alle cellule di supporto (cellule muscolari lisce e periciti). Questa fase è determinata dall'interazione tra il VEGF ed il recettore VEGFR-1 (Fong GH et al, 1995).

La gemmazione angiogenica prevede la formazione di nuovi vasi partendo da vasi maturi preesistenti grazie ad un processo di gemmazione verso tessuti non vascolarizzati. Tale processo è responsabile della vascolarizzazione di alcuni tessuti durante lo sviluppo embrionale, come ad esempio il tubo neurale e la retina, e della formazione di nuovi vasi nell'adulto, sia in processi fisiologici che patologici (Yancopoulos GD et al, 2000).

Questi processi, descritti più nel dettaglio nel paragrafo successivo, sono schematizzati nella Figura 2.

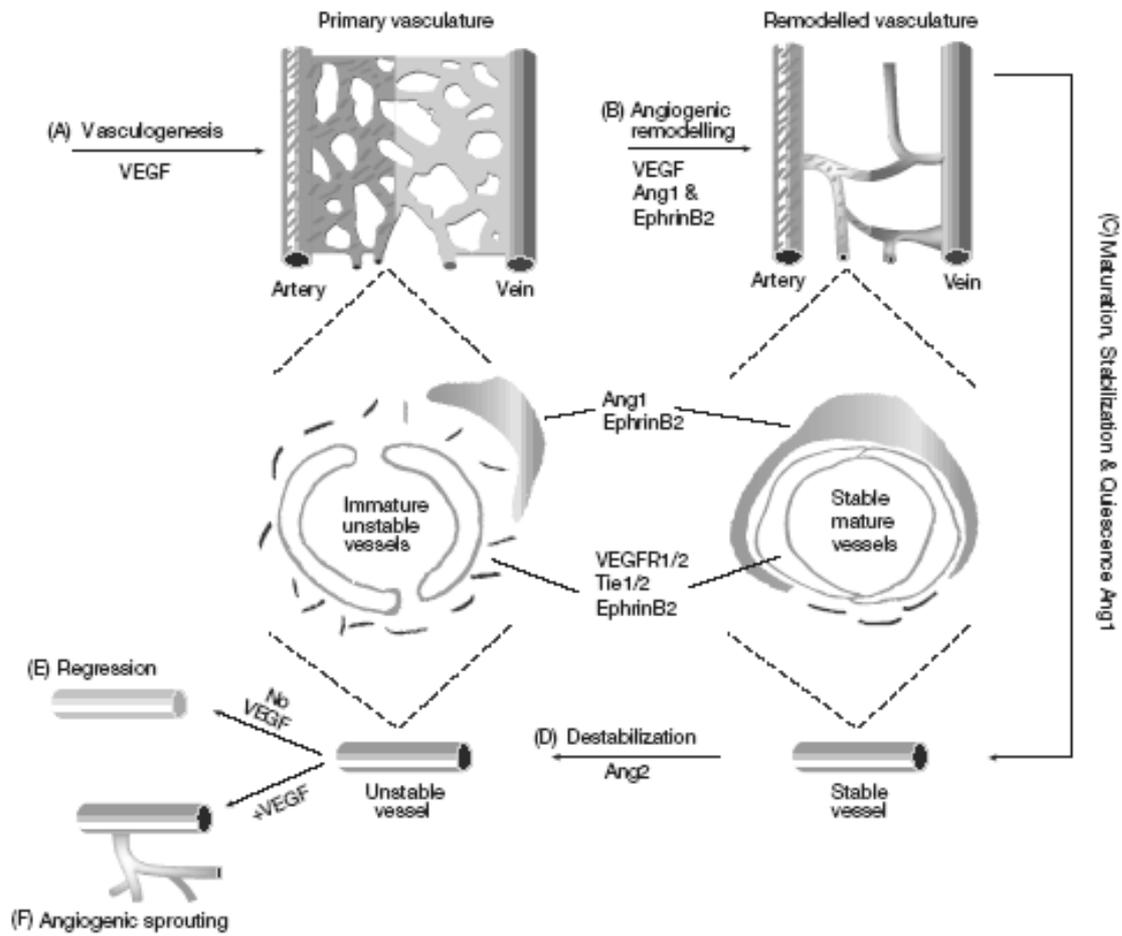


Figura 2: tappe attraverso cui si compie il processo angiogenetico (da Yancopoulos GD et al, 2000).

ANGIOGENESI: MECCANISMI

I vasi sanguigni sono costituiti da cellule endoteliali, a diretto contatto col sangue, periciti subendoteliali, cellule muscolari lisce, fibroblasti, membrana basale (BM) e matrice extracellulare (ECM).

Le cellule endoteliali sono coinvolte in modo centrale nel processo angiogenetico: migrano, proliferano e si assemblano in tubi instaurando tra loro giunzioni strette.

L'angiogenesi si articola in diverse fasi (Adams RH e Alitalo K, 2007):

- Destabilizzazione dei vasi preesistenti in seguito ad un aumento della permeabilità vasale e ad una perdita delle connessioni tra le cellule endoteliali; liberazione di enzimi proteolitici che degradano la matrice extracellulare: si creano quindi condizioni favorevoli per la gemmazione di nuovi capillari (sprouting) e per la successiva *migrazione* delle cellule endoteliali verso lo stimolo angiogenetico. Esiste, infatti, un gradiente di concentrazione dei fattori di crescita che agiscono come agenti chemiotattici per le cellule endoteliali in migrazione all'interno della matrice extracellulare.
- *Proliferazione* delle cellule endoteliali a monte delle cellule migranti
- *Differenziazione* delle cellule endoteliali caratterizzata da un arresto della proliferazione cellulare e dal loro rimodellamento in tubi capillari
- *Stabilizzazione* con richiamo di cellule periendotheliali di *supporto*, quali i periciti, nei capillari e le cellule muscolari lisce nei vasi di maggior calibro. Avviene così un rimodellamento dei neovasi che porta alla formazione di vasi maturi e alla comparsa del flusso sanguigno.

In condizioni normali, nell'organismo adulto, i processi angiogenetici avvengono secondo le regole sopradescritte e sono strettamente controllati. Si ha, infatti, angiogenesi solo durante il ciclo riproduttivo femminile o nella riparazione di danni tissutali come ad esempio le ferite (Burgos H, 1983). Al contrario, in condizioni patologiche, il fenomeno angiogenetico è disregolato.

Si crea, dunque, uno squilibrio nell'interazione tra segnali regolatori positivi e negativi, il processo diviene incontrollato e genera una rete vasale disordinata e mal funzionante (Lichtenbeld et al, 1996).

Numerose condizioni patologiche sono associate ad aumentata attività angiogenetica; tra queste ricordiamo le neoplasie, l'artrite reumatoide, la malattia di Crohn, la retinopatia diabetica, la psoriasi, l'endometriosi e l'aterosclerosi.

Nello sviluppo dei tumori e delle metastasi, in particolare, l'angiogenesi ha un'importanza cruciale (Folkman J, 1995).

Attivazione delle cellule endoteliali

In qualsiasi tipo di processo angiogenetico, sia fisiologico che patologico, l'inizio della risposta angiogenica si ha con l'attivazione delle cellule endoteliali, stimulate da citochine liberate dalle cellule tissutali a seguito di ipossia o ischemia. Le cellule tumorali ipossiche, i macrofagi e altre cellule del sistema immunitario, grazie allo stimolo dell'*hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1), producono il *fattore di crescita endoteliale* (VEGF) che provoca vasodilatazione e aumento della permeabilità vascolare ed il rilascio di proteasi, importanti per l'invasione cellulare e il rimodellamento dei tessuti. In aggiunta il VEGF previene l'apoptosi delle cellule endoteliali (Birner P et al, 2000).

La crescita tumorale, inoltre, determina alterazioni legate al metabolismo delle cellule tumorali (ipossia, acidosi e ipoglicemia), agli insulti meccanici (pressione generata dalle cellule in proliferazione), alle risposte infiammatorie e immunitarie (l'infiltrazione delle cellule nei tessuti) (Folkman J, Klagsburn M, 1987).

Alcuni oncogeni, come *v-ras*, *K-ras*, *v-raf*, *src*, *fos* e *v-yes*, inducono la sovraregolazione di fattori angiogenici come il VEGF, l'*Insulin-like growth factor-1* (IGF-1) ed il *Transforming growth factor- β* (TGF- β). Anche i prodotti degli oncogeni possono agire direttamente come fattori angiogenici o indirettamente accrescendo la produzione di citochine ed enzimi proteolitici. Al contrario, il gene oncosoppressore *p53* causa la degradazione dell'HIF-1, l'inibizione della produzione del VEGF e la stimolazione dell'inibitore trombospondina-1. La delezione di questo gene, quindi, rappresenta un ulteriore stimolo angiogenetico (Risau W, 1997).

Selezione delle cellule endoteliali che producono l'abbozzo vasale (sprouting)

È inoltre importante evidenziare solo alcune cellule endoteliali nel vaso capillare sono selezionate per migrare. I recettori Notch e i loro ligandi Delta-like-4 (DLL4) sono essenziali per la gemmazione delle cellule endoteliali durante lo sviluppo embrionale murino; infatti valori ridotti di DLL4 o il blocco di Notch incrementa a dismisura lo sprouting portando alla formazione di tubi endoteliali ramificati e tortuosi (Hellstrom M et al., 2007; Adams RH e Alitalo K, 2007). Allo stesso modo, l'inibizione del segnale Dll4-Notch in embrioni di Zebrafish comporta la formazione di reti capillari tortuose (Siekmann AF e Lawson ND, 2007). Il ruolo di Notch è stato confermato anche nell'angiogenesi patologica tumorale, infatti l'inibizione del segnale DLL4-Notch determina la formazione di neovasi poco funzionali con ipossia tumorale (Adams RH e Alitalo K, 2007).

Degradazione della membrana basale

Per iniziare la formazione di nuovi capillari, le cellule endoteliali dei vasi sanguigni esistenti devono degradare la membrana basale (BM) ed invadere lo stroma del tessuto adiacente. Questo processo richiede una cooperazione tra il sistema dell'*attivatore del plasminogeno* (PA) e quello delle *metalloproteasi della matrice* (MMPs) (Moller LB, 1993).

L'*urokinase-type plasminogen activator* (u-PA) e il *tissue-type plasminogen activator* (t-PA) sono serina-proteasi che convertono il plasminogeno in plasmina, proteina chiave nel processo di degradazione della fibrina. L'attività fibrinolitica nel sangue è regolata dal t-PA, invece l'u-PA determina l'attivazione del plasminogeno nel tessuto. L'u-PA è contenuto nei lisosomi delle cellule endoteliali. E' secreto da esse sotto stimolo della plasmina e del fattore XII della coagulazione e si lega al suo recettore u-PAR. La plasmina attivata si lega alle cellule endoteliali e degrada la matrice extracellulare (EMC) e le membrane basali (BM). Il legame della plasmina alla superficie cellulare le permette di essere protetta dall'inattivazione da parte dell'inibitore sierico α_2 -*antiplasmina*. La plasmina degrada diversi componenti di ECM quali fibrina, fibronectina, laminina, proteine core di proteoglicani e attiva le metalloproteasi MMP-1, MMP-3 e MMP-9 (Goezl EJ, 1996).

L'attività di PA e MMP è controllata a tre livelli (Goezl EJ, 1996):

- L'espressione di u-PA, u-PAR, MMP è sovraregolata da fattori di crescita angiogenici e citochine, in particolare dal VEGF e dal *Fibroblast growth factor- 2* (FGF-2);
- Pro-MMP e pro u-PA sono secreti come zimogeni e poi attivati proteoliticamente nella ECM dalla plasmina stessa;
- L'attività di MMP, plasmina, u-PA è regolata rispettivamente da TIMP, α_2 -*antiplasmina* e *Plasminogen Activator Inhibitor* (PAI). PA e MMP sono secreti assieme ai loro inibitori, garantendo uno stretto controllo dell'attività proteolitica locale, per proteggere la normale struttura tissutale. Tale regolazione si perde durante la crescita tumorale e metastatica.

Migrazione di cellule endoteliali e proliferazione: fattori angiogenetici

A seguito della degradazione proteolitica della matrice extracellulare, le cellule endoteliali iniziano a migrare. Segue una proliferazione di cellule endoteliali stimulate da una varietà di fattori di crescita come VEGF, Angiopoietina, FGF e citochine. La migrazione delle cellule endoteliali è finemente regolata dall'interazione tra le molecole di adesione delle cellule endoteliali, le integrine e la matrice extracellulare. La funzione delle integrine risulta regolata dall'interazione tra le semaforine e le plessine (Adams RH e Alitalo K, 2007).

Affinché la migrazione sia possibile, le cellule endoteliali devono acquisire un fenotipo invasivo e con motilità autonoma, produrre proteasi, degradare la membrana basale sub-endoteliale. Sulla base della elevata espressione del recettore VEGFR2 negli sprout pare evidente che la guida

determinante nella migrazione delle cellule endoteliali è fornita da VEGFA. Infatti un gradiente spaziale di VEGFA (164 murino, 165 umano) che lega l'eparan-solfato, funziona come segnale chemoattraente promovendo l'estensione polarizzata della cellula endoteliale. Una isoforma più piccola di VEGFA (120 murino, 121 umano) non lega l'eparan-solfato e incrementa la proliferazione delle cellule endoteliali ma non la migrazione e la formazione di una rete vascolare (Ruhberg C et al., 2002; Gerhardt H et al., 2003). Le neurofiline (NRP1 e 2) sono recettori transmembrana che possono legare le semaforine e il VEGF potrebbero essere coinvolte in questa differenza in quanto NRP1 può legare solo il VEGFA coniugato con l'eparansolfato (VEGF165) (Neufeld G et al., 2002; Pan Q et al., 2007).

Un ruolo importante nel controllo della migrazione e della organizzazione delle cellule endoteliali nei neovasi è sicuramente fornito dalle semaforine. Queste sono membri di una famiglia di proteine secrete o di membrana inizialmente caratterizzate come fattori indirizzanti la migrazione degli assoni delle cellule neuronali. Sono recettori delle semaforine le plessine e le neurofilline (Neufeld G e Kessler O, 2008). Sono state identificate diverse forme di semaforine; grazie all'interazione con i loro recettori, le plessine, le semaforine sono in grado di regolare l'espressione delle integrine e di alcune strutture del citoscheletro determinando, quindi la motilità e la formazione di vasi da parte delle cellule endoteliali (Serini G et al, 2003). Caso particolare sono le semaforine di classe 3 (Sema3) che non legano le plessine bensì la neurofilina 1 e 2 che formano un complesso recettoriale attivante le plessine. Inoltre, come già indicato in precedenza, le neurofiline legano altri fattori di crescita vascolari quali il VEGF e presentano un effetto proangiogenetico portando alla formazione di una rete vasale ordinate e correttamente ramificata. (Neufeld G e Kessler O, 2008). E' stato descritto, nelle cellule endoteliali, il ruolo di un'altra semaforina, Sema4D, e del suo recettore, la plessina B1, nel determinare riorganizzazione del citoscheletro, motilità e formazione di tubuli. Tale effetto si esplica attraverso l'attivazione del recettore tirosin chinasi Met ed è indipendente dall'attivazione di fattori angiogenetici quali VEGF e Angiopoietina (Conrotto P et al, 2005).

La stragrande maggioranza dei fattori coinvolti nell'angiogenesi legano gli eparan solfati (FGFa, FGFb, VEGF, PIGF, HGF). E' stato dimostrato che gli eparan solfati sono necessari per l'interazione tra il fattore ed il suo recettore. Infatti, nei modelli di analisi dell'angiogenesi l'eparina a basse concentrazioni agisce da attivatore del processo angiogenetico, presentando queste molecole ai loro recettori. Un eccesso di eparina solubile, invece, può sequestrare i fattori lontano dall'eparan solfato della superficie cellulare e della matrice, inibendo così l'angiogenesi (Yancopoulos GD et al, 2000).

È necessario, inoltre, un cenno sul complesso sistema Angiopoietine-recettori Tie. Sono infatti identificati e studiati due recettori tirosin chinasi specifici per le cellule endoteliali, detti Tie-1 e Tie-2. È stato osservato che tali recettori sono coinvolti nella maturazione dei vasi sanguigni. I ligandi per Tie-2 sono l'Angiopoietina-1 (Ang-1) e l'Angiopoietina-2 (Ang-2), molecole scoperte da Yancopoulos nel 1996. Il legame di Ang-1 con il recettore Tie-2 determina il reclutamento di cellule periendotheliali, che servono a stabilizzare i vasi neoformati, e media la maturazione dei vasi, da semplici tubuli a strutture più complesse, contribuendo a mantenere quiescenti le cellule endoteliali (Davis S et al, 1996). Ang-1 è criticamente importante nella formazione della rete vascolare durante lo sviluppo embrionale (Suri C et al., 1996) inoltre l'iperespressione del gene ang-1 ha comportato l'induzione di una attiva neoangiogenesi in tessuti ischemici (Shim WS et al., 2007). Tuttavia sorprendentemente Ang-1 è risultato inibire l'espansione vascolare patologica in quanto favorisce la maturazione vascolare (Stoeltzing O et al., 2003). Pertanto ancora oggi il ruolo di Ang-1 risulta complesso e complessivamente favorente la crescita vasale pur in assenza di effetti mitogeni diretti sulle cellule endoteliali; infatti i topi transgenici che non esprimono Ang-1 hanno prevalentemente alterazioni dell'interazione tra le cellule endoteliali e perivascolari (Suri C et al., 1996; Shim WS et al., 2007)

Altrettanto controverso è il ruolo di Ang-2, antagonista naturale di Ang-1; presenta una azione agonista-antagonista su Tie-2 che dipende dal contesto tissutale in cui esso avviene. Infatti l'overespressione embrionale di Ang-2 comporta la distruzione dello sviluppo vascolare suggerendo un effetto anti-angiogenetico (Maisonpierre PC et al, 1997). Inoltre controbilancia gli effetti proangiogenetici di VEGF antagonizzando il sinergismo VEGF-FGF (Ley CD et al., 2004). Tuttavia l'analisi di espressione in neoplasie solide o la overespressione di Ang-2 in linee tumorali ha evidenziato un ruolo controverso talora correlato con una minore angiogenesi e, altre, con una aumentata neovascolarizzazione e malignità (Shim WS et al., 2007).

Il comportamento variabile di Tie-2 e dei suoi ligandi nella sopravvivenza endoteliale, crescita e maturazione vascolare può essere intrinseca a differenti tipi di tumori, oppure alla differente interazione con i recettori per le integrine oppure ancora alla complessità delle isoforme di ANG-1 e 2 e della possibile formazione di eterodimeri tra Tie-2 e Tie-1. Sicuramente la precedente visione di un effetto proangiogenetico di Ang-1 controbilanciato da Ang-2 è sicuramente troppo semplificativa (Shim WS et al., 2007)..

I principali fattori coinvolti nelle diverse fasi dell'angiogenesi sono riassunti nella Tabella 1; in questa trattazione saranno analizzati nel dettaglio i meccanismi d'azione del VEGF, nei capitoli successivi.

Induttori in vitro	Proliferazione	Migrazione	Differenziazione
Fattori di crescita peptidici che legano l'eparina			
VEGF	Sì	Sì	Sì
PIGF	Debole	Sì	?
FGF-1, FGF-2	Sì	Sì	Sì
Pleiotropina	Sì	?	Sì
HIV-tat	Debole	Debole	Sì
PDGF	Sì	Sì	Sì
HGF/SF	Sì	Sì	Sì
Fattori di crescita peptidici che non legano l'eparina			
TGF- α	Sì	Sì	Sì
TGF- β	Inibizione	No	Sì
EGF	Sì	Sì	Sì
IGF-I	Sì	Sì	Sì
Mediatori dell'infiammazione			
TNF- α	Inibizione	No	Sì
IL-8	Sì	Sì	?
IL-3	Sì	Sì	Sì
Prostaglandine E1, E2	No	No	Sì
Enzimi			
PD-ECGF/TP	No	Sì	?
COX-2	No	Sì	Sì
Angiogenina	No	Sì	Sì
Ormoni			
Estrogeni	Sì	Sì	Sì
Proliferina	?	Sì	?
Oligosaccaridi			
Oligosaccaridi ialuronati	Sì	Sì	Sì
Gangliosidi	?	?	?
Fattori ematopoietici			
Eritropoietina	Sì	?	Sì
G-CSF	Sì	Sì	?
GM-CSF	Sì	Sì	?
Molecole di adesione cellulare			
VCAM-1	No	Sì	?
E-selettine	No	Sì	Sì
Integrine	No	Sì	Sì
Semaforine (Sema3 e 4D)	No	Sì	Sì
Altri			
Ossido nitrico	Sì	?	?
Angiopoietina-1	No	Sì	Sì

Tabella 1: Induzione della proliferazione, migrazione e differenziazione da parte di diversi fattori implicati nell'angiogenesi.

Trasformazione degli abbozzi vascolari in vasi funzionanti.

Una volta creato l'abbozzo vasale, questo cresce in lunghezza mediante la proliferazione delle cellule endoteliali all'interno dell'abbozzo ma non all'estremità dello stesso come descritto avvenire nello sviluppo della retina murina (Gerhardt H et al., 2003). Queste differenze nelle caratteristiche mitotiche delle cellule endoteliali dell'abbozzo vascolare (sprout) e la differente espressione di VEGFR2, Dll4 e Pdgfb indicano che le cellule endoteliali alla punta ed alla radice dell'abbozzo sono differenti (Adams RH e Alitalo K, 2007).

Interessante approfondire come l'abbozzo vascolare in crescita possa formare una nuova connessione con un vaso preesistente o in crescita; a tale scopo le cellule endoteliali alla testa dell'abbozzo devono perdere il loro fenotipo esplorativo attraverso interazioni cellula-cellula (Adams RH e Alitalo K, 2007).

Infine, affinché si generi un flusso vascolare all'interno dell'abbozzo vasale, è necessaria la formazione di un lume che può avvenire anche contemporaneamente alla crescita dell'abbozzo. Benché tale processo non sia ancora del tutto compreso, vi è evidenza che avvenga una pinocitosi "cell drinking" e la conseguente formazione di vacuoli sempre più grandi che si fondono tra di loro a formare un lume, come evidenziato nello zebrafish (Kamei M et al., 2006). Tale processo potrebbe essere regolato da interazione tra le integrine e la matrice extracellulare con attivazione delle GTPasi CDC42 e Rac1 (Davis GE e Bayless KJ, 2003). La formazione del lume vascolare e della tubuli genesi pare anche controllata da EGF-like domain-7 (EGFL7).

La creazione del lume e l'arrivo del flusso ematico potrebbe stabilizzare le nuove connessioni, infatti l'aumento di trasporto di ossigeno determina espressione locale di VEGFA; inoltre il reclutamento di periciti, di VSMCs e la deposizione della membrana basale endoteliale promuove la maturazione e la quiescenza del vaso (Adams RH e Alitalo K, 2007). La migrazione dei periciti e delle VSMCs è regolata dall'interazione PDGFR β -PDGFB (Armulik et al., 2005) e la costruzione del complesso periciti-VSMCs-endotelio nel formare una parete vascolare matura avviene mediante le complesse interazioni tra le angiopoietine e i loro recettori (vedi sopra).

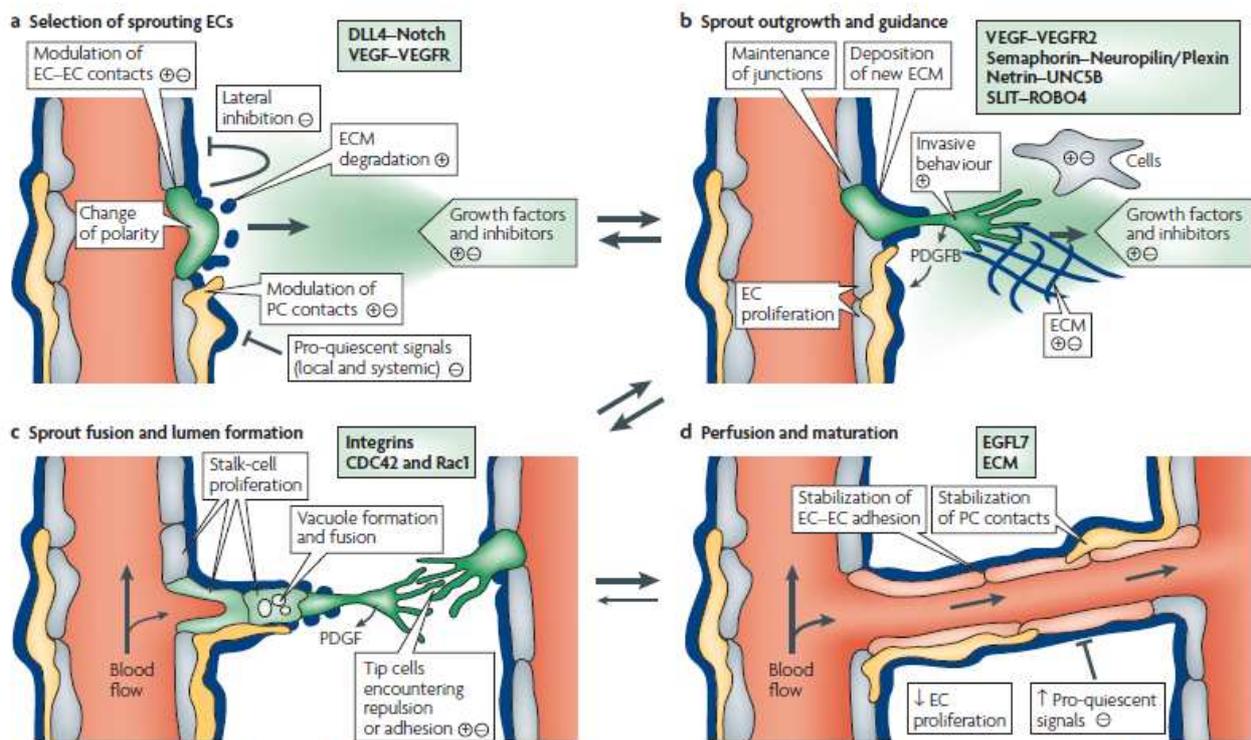


Figura 3 (da Adams RH e Alitalo K, 2007). Angiogenic sprouting. a) la formazione dell'abbozzo vascolare è controllata da un'alterazione dell'equilibrio tra fattori pro-angiogenetici (per es. VEGF) e fattori che favoriscono la quiescenza (per es. periciti, alcune molecole della matrice extracellulare, ecc...) per cui alcune cellule endoteliali (ECs) possono formare abbozzi vascolari (sprouts) modificando la polarità e acquisendo un fenotipo esplorativo-invasivo, modificando l'interazione con la matrice e attivandosi a degradare la matrice stessa. b) La crescita dell'abbozzo è guidata da un gradiente di VEGF. Il rilascio di PDGFB dalle cellule all'estremità dell'abbozzo promuove il reclutamento dei periciti. c) Mediante interazioni adesive cellula-cellula si creano anastomosi con altri abbozzi vascolari adiacenti o con altri vasi esistenti. Si forma quindi un lume mediante la fusione di vacuoli. d) Processi di fusione all'interfaccia tra cellule endoteliali permette di formare un lume continuo. Il flusso ematico aumenta la distribuzione di ossigeno ai tessuti e di conseguenza reduce I segnali pro-angiogenetici che sono indotti dall'ipossia. La stessa perfusione potrebbe inoltre promuovere la maturazione delle pareti vasali. La riduzione della produzione di fattori proangiogenetici determina quindi la retrazione di altri sprouts in formazione.

VEGF (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR).

Nel 1983 viene scoperto il *Vascular Permeability Factor* (VPF), responsabile della permeabilità dei vasi associati al tumore. Nel 1989 il *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) viene isolato e clonato in laboratorio dal gruppo di Napoleone Ferrara, ricercatori della Genentech. Essi dimostrarono come VPF e VEGF fossero la stessa molecola (Leung DW et al., 1989; Hicklin DJ, Hellis LM, 2005).

Il VEGF ha un ruolo fondamentale nella regolazione dell'angiogenesi fisiologica e patologica. Nell'uomo ne esistono diverse isoforme, rispettivamente di 206, 189, 183, 148, 165, 145 e 121 aminoacidi (Ogawa S et al, 1998; Harper SJ e Bates DO, 2008). La specie molecolare predominante è il VEGF₁₆₅ che si presenta come una glicoproteina omodimerica basica, solubile o associata alle cellule, che si lega agli eparansolfati (Lichtenbeld HHC et al, 1996). Nel 2002 è stata identificata una nuova isoforma di VEGF-A₁₆₅ generata da una variata di splicing all'esone 8 distale; è pertanto emerso che è possibile si generi una variante "b" del VEGF-A che differisce esclusivamente per i 6 aminoacidi terminali ma che ha lo stesso numero di residui della variante "a" ma presenta un effetto antiangiogenetico (Bates DO et al., 2002).

Sono stati anche identificati 4 geni strutturalmente correlati al VEGF i cui prodotti sono conosciuti come *Placental growth factor* (PlGF), VEGF-A (o VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E (Ogawa S et al, 1998 e Meyer M et al, 1999).

Il VEGF è espresso in tessuti differenti quali cervello, fegato, rene e milza; è stato ritrovato anche nell'ovaio durante la formazione del corpo luteo, nell'utero durante la crescita dell'endometrio vascolare e nella fase proliferativa della cicatrizzazione di una ferita (Zhi H e Shi-Deng B, 2004).

Il VEGF viene iperespresso da diversi tipi cellulari di tumori quali il carcinoma prostatico, il cancro della vescica, il neuroblastoma, il carcinoma del colon-retto, il carcinoma della cervice uterina, il carcinoma mammario, il cancro della laringe, il carcinoma a cellule renali, il mieloma multiplo, il sarcoma di Kaposi, il cancro dell'esofago, l'epatocarcinoma, il tumore polmonare non a piccole cellule, alcuni tumori endocrini (Turner HE et al, 2003) (adrenomidollari, tiroidei e paratiroidei), l'emangioma, il glioblastoma (Holash J et al, 1999), il melanoma e molti altri ancora (Masabumi S, 2003). L'iperespressione di VEGF non è esclusiva solo delle neoplasie solide, è a tale proposito importante l'esempio della leucemia mieloide cronica (CML) che associata all'oncogene BCR/ABL, induce l'espressione del VEGF promuovendo l'espressione di HIF-1 (Birner P et al, 2000). E' stata inoltre dimostrata una sovraespressione di VEGF e dei suoi recettori nella displasia bronchiale, indicando che l'angiogenesi è un evento precoce nel carcinoma broncogeno (Merrick DT et al, 2005).

Va segnalato che vi è stato recente interesse nell'esplorare l'espressione dell'isoforma "b" del VEGF-A. E' risultato che molti tessuti sani hanno una espressione basale predominante di VEGF-Ab, mentre solo la placenta, in cui vi è una attiva angiogenesi, presenta una overespressione di isoforma "a". Anche alcune neoplasie possono esprimere l'isoforma "b" (Harper SJ e Bates DO, 2008).

Sono stati identificati tre recettori di tipo tirosin chinasi per la famiglia del VEGF, denominati VEGFR-1 (conosciuto anche come Flt-1) a cui si legano VEGF-A e VEGF-B; VEGFR-2 (KDR/Flk-1) a cui si legano VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E; VEGFR-3 (KDR/Flt-1) i cui ligandi sono VEGF-C e VEGF-D. VEGFR-1 è ampiamente presente sull'endotelio vascolare; VEGFR-2 è un recettore con minore affinità identificato su cellule endoteliali, tumorali e monociti; infine il VEGFR-3 è presente sull'endotelio del sistema linfatico (Ferrara N et al, 2003).

VEGFR-1 e 2 sono organizzati in 3 regioni, una extracellulare, formata da 7 domini *immunoglobulin-like*, una transmembrana ed una intracellulare, responsabile dell'attività tirosin-chinasica. L'interazione recettore-ligando determina dimerizzazione e autofosforilazione del recettore con attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale: proliferazione delle cellule endoteliali attraverso la via delle MAP chinasi e sopravvivenza attraverso la serina-treonina chinasi Akt (Zhi H e Shi-Deng B, 2004).

Gli effetti biologici di VEGF sono diversi in funzione del tipo di recettore con il quale interagisce. Mentre l'interazione del VEGF-A con VEGFR-2 è seguita *in vitro* da proliferazione, migrazione e "sprouting" delle cellule endoteliali e contribuisce alla formazione di strutture tubulari, nessun effetto mitogeno segue il legame di VEGF con VEGFR-1. Questa seconda interazione attiva la via del fosfatidil inositolo (PI3) e pare essere coinvolta in fasi più tardive dell'angiogenesi, ossia nel rimodellamento e nella stabilizzazione dei vasi. Studi condotti su topi knock-out per VEGFR-1, infatti, hanno evidenziato la perdita dell'organizzazione morfologica con cellule endoteliali in eccesso nel lume dei canali vascolari (Fong GH et al, 1995). VEGFR-1 può essere considerato un antagonista di VEGFR-2, perché sequestrando il VEGF blocca il segnale di trasduzione attraverso il VEGFR-2, risultando un regolatore negativo dell'angiogenesi (Ferrara N et al, 2003). Tuttavia revisioni più recenti evidenziano un ruolo ancora non ben definito di tale recettore (Shibuya M e Claesson-Welsh L, 2006).

VEGF, quindi, stimola la degradazione della matrice, la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali, azione attribuita in parte all'attivazione dell'ossido nitrico (NO) e della MAP chinasi, e induce in queste cellule l'espressione di u-PA, PAI-1, u-PAR e MMP-1 (Ferrara N et al, 2003).

Diversi meccanismi sono coinvolti nella regolazione del gene per il VEGF. Un ruolo rilevante è giocato dalla tensione tissutale di O₂, come dimostrato dall'aumento reversibile dei livelli di mRNA per il VEGF in condizioni di ipossia *in vivo* e *in vitro* (Birner P et al, 2000). L'aumento

dell'espressione di VEGF mRNA è mediato principalmente dal fattore di trascrizione *hypoxia-inducible factor 1* (HIF1), che si lega ad un sito di riconoscimento nella regione promotrice del gene del VEGF. Oltre all'incremento della trascrizione, si verifica quindi una aumentata stabilità del messaggero tramite fissazione di tale proteina. L'induzione ipossica dell'espressione di VEGF è anche mediata dall'adenosina tramite i recettori α_2 e dall'aumento di cAMP intracellulare conseguente e dall'attivazione della via di traduzione correlata a c-src. E' stata proposta una regolazione ipossica dei recettori del VEGF: in presenza di bassa tensione di ossigeno si verificherebbe infatti una "up-regulation" dei VEGFR (Ferrara N et al, 2003).

E' stato riscontrato che il messaggero di VEGF è regolato a livello trascrizionale e post-trascrizionale anche da deficit di glucosio, suggerendo che VEGF è un gene indotto da stimoli stressanti (Lichtenbeld HHC et al, 1996).

Numerose citochine inoltre sono in grado di operare indirettamente una sovraregolazione dell'mRNA di VEGF, con conseguente sintesi proteica e secrezione del fattore di crescita endoteliale.

Inducono infatti l'espressione di VEGF (Liekens S et al, 2001):

- TGF- α , TGF- β ed EGF
- i mediatori della risposta infiammatoria quali interleuchine e PGE₂
- IGF-1
- l'attivazione delle proteine chinasi C e A
- l'oncogene *ras* e l'overespressione di *v-raf* o *v-src*
- le proteine regolatrici del ciclo cellulare quali p53 ed il gene oncosoppressore di Von Hippel-Lindau (VHL).

Nell'embrione, il VEGF legandosi al VEGFR-2 induce la differenziazione e proliferazione delle cellule endoteliali e, attraverso il legame con il VEGFR-1, porta alla formazione di tubuli immaturi. Successivamente, l'Ang-1, agendo attraverso il recettore Tie-2, promuove il rimodellamento, la maturazione e la stabilizzazione dei vasi. Ciò avviene per mezzo dell'interazione tra le cellule endoteliali e le cellule di supporto (cellule muscolari lisce e periciti): le prime esprimono Tie2 e le seconde producono l'angiopoietina 1 (Ang-1), che agisce in maniera paracrina ed ha un ruolo coordinato e complementare a quello del VEGF (Holash J et al, 1999).

Alcuni studi *in vivo* confermano questi dati, dimostrando che Ang-1 ha un ruolo complementare al VEGF-A, nelle fasi più avanzate dello sviluppo vascolare. La mancanza di Ang-1 o Tie2, determina un apparente normale sviluppo vascolare iniziale, per le fasi dipendenti dal VEGF-A, tuttavia si verifica un'alterazione nel rimodellamento e nella stabilizzazione della architettura vascolare e conseguente morte dell'embrione. Le cellule endoteliali, in mancanza di Ang-1, non riescono ad

interagire ed aderire alle cellule di supporto sottostanti, hanno un aspetto tondeggianti come se non fossero ben adese alle cellule di supporto ed alla matrice extracellulare, con conseguente alterazione del rimodellamento e possibile regressione dei vasi (Streit M e Detmar M, 2003).

La delezione del gene del VEGF induce una diminuita vasculogenesi e angiogenesi, anche in topi eterozigoti e la morte avviene al giorno embrionale 11. I topi knock-out omozigoti per il VEGFR-2 che muoiono al nono giorno embrionale, mancano sia delle cellule endoteliali che di un sistema ematopoietico sviluppato, indicando così il VEGF come un segnale nella determinazione primaria di un progenitore ematoangioblastico e poi delle cellule endoteliali (Ferrara N et al, 2003). Al contrario i topi knock-out per il gene del VEGFR-1, che anch'essi muoiono intorno al nono giorno, hanno progenitori ematopoietici normali e abbondanti cellule endoteliali, che migrano e proliferano, ma non si assemblano in tubi e vasi funzionali (Holash J et al, 1999). Questi due recettori molto simili mandano distinti segnali alle cellule endoteliali.

Va inoltre ricordato che VEGF può legare le neurofiline (NRP1 e 2) sono recettori transmembrana che possono legare sia le semaforine sia il VEGF potenziandone l'affinità per il recettore VEGFR; è stato ipotizzato inoltre che il legame VEGF-NRP potesse determinare l'attivazione della trasduzione del segnale e quindi un'azione proangiogenetica indipendentemente dall'attivazione del VEGFR2, tuttavia tale via di segnale non è ancora completamente conosciuta (Ellis LM e Hicklin DJ, 2008).

L'azione di VEGF-A esclusiva sulle cellule endoteliali è stata recentemente rivalutata alla luce del riscontro che esso non presenta come unico bersaglio solo le cellule endoteliali. Infatti è stato evidenziato che mutazioni nel promoter del gene vegfa possono determinare una forma di malattia del motoneurone nel topo non associata ad alterazioni angiogenetiche e che VEGF-A ha effetti neuro protettivi (Lambrechts D et al., 2003); inoltre VEGF-A presenta effetti protettivi sui podociti mediante la attivazione delle nefrine (Foster RR et al., 2005).

VEGF e trasduzione del segnale

Il VEGF isoforma "a" determina dimerizzazione e fosforilazione del suo recettore VEGFR. Nel caso specifico del VEGFR 2, la dimerizzazione dipende dal dominio Ig-like 3 della porzione extracellulare e comporta l'autofosforilazione di specifici residui di tirosina all'interno del complesso dimerico.

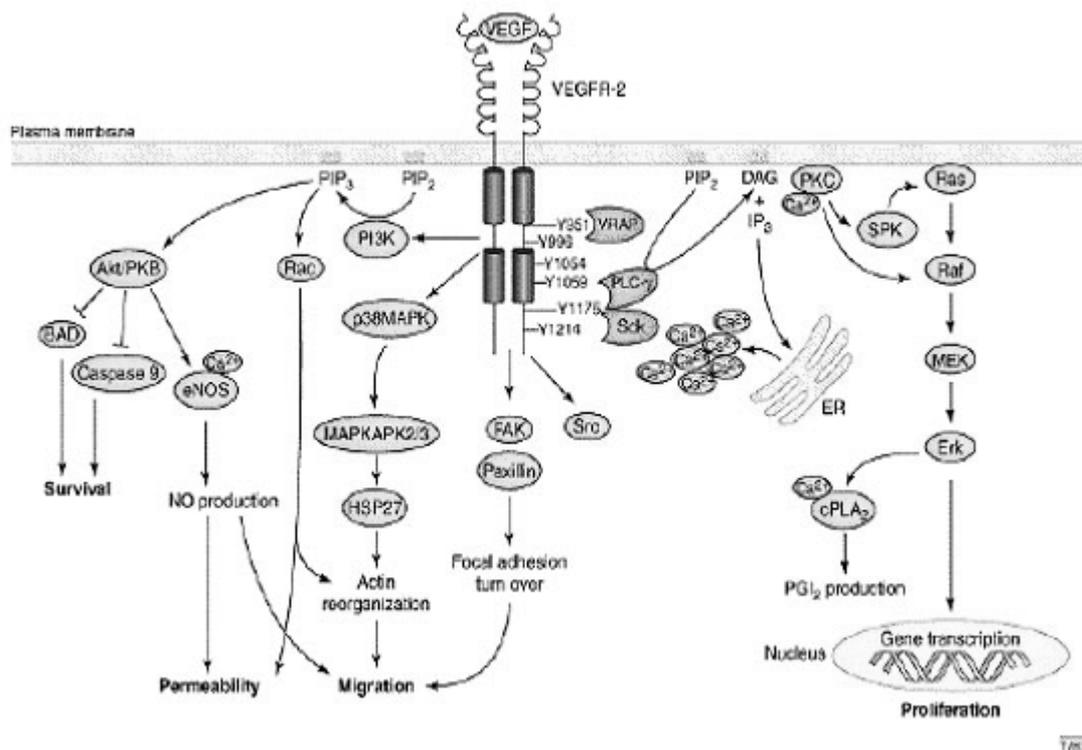


Figura 4: vie di traduzione del segnale attivate da VEGF-A/VEGFR (da Cross MJ et al, 2003).

Il recettore tirosina chinasi VEGFR-2 è responsabile dell'attività angiogenica di VEGF-A₁₆₅: l'attività chinastica e la sua autofosforilazione vengono promosse quando due molecole di VEGFR-2 legano gli aminoacidi 110 N-terminali dei due monomeri dimerizzati di VEGF-A₁₆₅.

VEGF-A₁₆₅ induce l'autofosforilazione di VEGFR-2, su alcuni residui di tirosina che servono come *docking site* per molecole del segnale, come PI3K e PLC- γ . Nelle cellule endoteliali, i residui specifici di tirosina che contribuiscono al reclutamento e all'attivazione di PLC- γ , indotta da VEGF-A₁₆₅, sono diversi a seconda del *pathway* e dal tipo cellulare considerato (Masabumi S, 2003). I pathways più comuni nelle cellule endoteliali sono: il legame di VEGF a VEGFR-2 comporta la dimerizzazione del recettore, l'attivazione intracellulare di the PLC γ e a cascata di PKC-Raf-MEK-mitogen-activated protein kinase (MAPK) con stimolo alla sintesi del DNA e alla proliferazione cellulare; la contemporanea attivazione del pathway PI3K-Akt favorisce una maggior sopravvivenza della cellula endoteliale. L'attivazione di src, invece, può comportare l'attivazione del citoscheletro e favorire la migrazione della cellula endoteliale (Shibuya M e Claesson-Welsh L, 2006).

I recettori del VEGF sono in genere localizzati sulla superficie endoteliale tuttavia è possibile anche una localizzazione intracellulare del VEGFR-2 che, anche in questo caso, è coinvolto nel favorire la sopravvivenza delle cellule endoteliali con meccanismi ancora non del tutto noti (Kerbel RS, 2008).

La stimolazione endoteliale di VEGF-A₁₆₅ genera rapidamente NO e un incremento nella trascrizione di eNOS, che sono implicati nella risposta cellulare alla migrazione, proliferazione nella formazione di tubuli, nell'aumentata permeabilità vascolare e nell'angiogenesi (Kerbel RS, 2008)..

Attraverso i suoi residui fosforilati in tirosina VEGFR-2 attivato diventa bersaglio di molecole contenenti domini SH2 e SH3 tra cui le tirosine fosfatasi Shp-1 e Shp-2. Le fosfatasi sono coinvolte nella regolazione dell'attività dei recettori dei fattori di crescita. Le tirosine fosfatasi *src homology 2 (SH2) domain-containing tyrosine phosphatases* (Shp-1 e Shp-2) associano *in vitro* con VEGFR-2. Le conseguenze biologiche di questa associazione non sono ancora state completamente spiegate. Shp-2 si lega al recettore VEGFR-2 attivato da VEGF e ne causa defosforilazione. La formazione di questo complesso transitorio tra Shp-2 e VEGFR-2 dipende dalla fosforilazione del residuo Y1175 che si trova nella coda C-terminale di VEGFR-2 e che rappresenta un importante sito di interazione con le molecole a valle del *signaling* di VEGF-A₁₆₅ tipo PI3-K e PLC- γ (Cross MJ et al, 2003).

La stimolazione con VEGF-A₁₆₅ causa una redistribuzione della fosfatasi che si trova inizialmente nel citosol e che poi tende a colocalizzarsi con VEGFR-2 in punti di membrana ad alta densità recettoriale. Si riscontrano tali cambiamenti morfologici nella cellula stimolata, in un intervallo di tempo di circa due ore; si può individuare un fronte migratorio e una direzione di movimento. Ciò fa supporre che questi siti, dove le due proteine colocalizzano, siano punti di contatto che si formano e si disassemblano per favorire il movimento cellulare. Probabilmente la PTP viene richiamata per svolgere il suo compito defosforilante, nei confronti delle proteine del complesso, e per conferire alla cellula le condizioni pro-migratorie. Shp-2 WT favorisce la compartimentalizzazione di VEGFR-2 in strutture simili agli endosomi. Molti recettori per i fattori di crescita vengono internalizzati subito dopo essere stati attivati e poi destinati al *pathway* degradativo o al *re cycling* (Cross MJ et al, 2003).

È interessante evidenziare inoltre anche gli effetti del VEGF isoforma "b"; esso differisce solo in 6 aminoacidi carbossiterminali ma comporta differenze radicali nell'effetto biologico e nella segnalazione recettoriale. Il ligando isoforma a determina come descritto sopra dopo la dimerizzazione un cambio conformazionale del VEGFR con rotazione interna della chinasi del dominio intracellulare con conseguente auto fosforilazione (Ruch C et al., 2007). La sostituzione della cisteina e della arginina con aminoacidi con carica neutra lisina e aspartato della isoforma "b" comportano un minor cambio conformazionale ed un segnale meno efficiente e transitorio, rapida inattivazione della chinasi e attivazione solo transiente di ERK essenziale nei processi angiogenetici; inoltre non lega la neurofilina 1 (Cebe Suarez S et al., 2006; Harper SJ e Bates DO, 2008). Dal momento che il VEGF-A è costituito da un dimero, la possibilità che si possano

generare etero dimeri tra isoforme a e b aggiunge complessità al sistema (Harper SJ e Bates DO, 2008).

Come conseguenza di quanto espresso sopra, la stimolazione delle cellule endoteliali con VEGF-A_{165b} non determina migrazione, proliferazione delle cellule endoteliali o vasodilatazione capillari (Bates DO et al., 2002). Dato ancora più interessante è il fatto che VEGF-A_{165b} inibisca l'angiogenesi patologica in modelli animali sia murini, sia di membrana corioallantoidea di pollo, sia della cornea di coniglio (Harper SJ e Bates DO, 2008). Inoltre alcune neoplasie overesprimono l'isoforma "b" del VEGF-A favorendo una minore vascolarizzazione ed aree di necrosi ed effetti inibenti la crescita tumorale (Rennel ES et al., 2008).

ANGIOGENESI TUMORALE

La crescita tumorale è un processo a più tappe che inizia con la perdita del controllo della proliferazione cellulare. Le cellule neoplastiche iniziano a dividersi rapidamente dando luogo a una piccola massa tumorale sferoidale, un carcinoma *in situ*. Con la crescita della massa, le cellule tumorali si trovano sempre più distanti dai capillari; si arresta quindi la crescita e viene raggiunto lo stato stazionario (steady state), in cui il numero di cellule che proliferano è controbilanciato dal numero di cellule che muoiono. Le dimensioni ristrette sono determinate dalla mancanza di ossigeno e nutrienti. Nei tessuti, il limite di diffusione dell'ossigeno corrisponde ad una distanza di 100 µm tra i capillari e le cellule, che corrisponde a 3-5 strati di cellule attorno al singolo vaso. Il carcinoma *in situ* può rimanere silente o latente per molti anni e le metastasi sono raramente associate a questi piccoli tumori non vascolarizzati (2-3 mm di diametro). Intorno al 1970, fu proposto che la formazione di una microcircolazione permettesse la crescita del tumore di oltre pochi mm e alla fine degli anni '80 si arrivò alla conclusione che il tumore è angiogenesi-dipendente e che le cellule metastatiche diffondono solo dopo che il tumore stabilizza la sua microcircolazione (Yancopoulos GD et al, 2000).

La neovascolarizzazione del tumore può avvenire attraverso differenti meccanismi che dipendono dal tipo di tumore, dallo stadio di sviluppo e dalla sede anatomica. Molti tumori, soprattutto i tumori di origine epiteliale, che inizialmente risultano separati dai vasi circostanti dalla membrana basale, iniziano a crescere come masse avascolari. L'angiogenesi ha inizio in seguito al rilascio di VEGF e di altri fattori angiogenetici da parte delle cellule neoplastiche ipossiche. Per altri tipi di neoplasie, come ad esempio i linfomi, si ha un meccanismo differente; non si forma una massa avascolare ma le cellule neoplastiche in proliferazione si dispongono attorno ai vasi dell'ospite e li reclutano (la cosiddetta co-option vasale). Questi vasi, per la risposta dell'ospite, tendono a regredire. Le cellule neoplastiche divengono allora ipossiche e liberano grandi quantità di fattori angiogenetici che innescano una robusta risposta angiogenetica con gemmazione di nuovi vasi e ripresa della vascolarizzazione e, quindi, della crescita del tumore (Kerbel R, 2008).

Interazione cooption-angiogenesi

Una iniziale fase di crescita avascolare sembra essere una caratteristica delle cellule tumorali notata all'interno di strutture avascolari come la cornea, la camera anteriore dell'occhio e nelle cellule tumorali impiantate in spazi virtuali come nel sottocutaneo o nel peritoneo. Inoltre è caratteristica dei tumori precoci delle strutture epiteliali essere separati attraverso la membrana basale dai vasi sottostanti. Altre evidenze suggeriscono che molti tumori non si comportino dall'inizio come una struttura avascolare, in particolare quando crescono vicino ai confini del tessuto vascolarizzato. In

questi casi le cellule tumorali cooptano i vasi sanguigni esistenti. L'interazione tra questo meccanismo e la successiva angiogenesi indotta dal tumore non è stato studiato in maniera esauriente. Uno studio ha osservato, in un modello di glioma nel ratto, il cambiamento che avviene nella vascolarizzazione tumorale durante la sua crescita. Dopo aver cooptato i vasi dell'ospite il tumore cresce all'inizio come una massa ben vascolarizzata. Nei tumori relativamente piccoli, i vasi continuano ad esprimere il recettore Tie-2 agli stessi livelli del tessuto ospite. La sovraregolazione del messaggio dell'Angiopietina-2 diventa evidente nei vasi tumorali, mentre l'espressione di VEGF nelle cellule circostanti è minima. Questo, durante la progressione della crescita, porta alla regressione di molti vasi al centro del tumore, risultando in una necrosi massiva delle cellule tumorali centrali. Le cellule tumorali che sopravvivono formano delle cuffie attorno ai pochi vasi rimanenti all'interno. Queste cellule e quelle che si trovano ai margini della massa tumorale, a causa dell'ipossia, esprimono livelli elevati di VEGF. Allo stesso tempo le cellule della periferia esprimono elevate quantità di Angiopietina-2 e del suo recettore. Questo risulta in una tenace attivazione dell'angiogenesi, permettendo al tumore di espandersi attraverso l'invasione del tessuto normale (Holash J et al, 1999; Yancopoulos GD et al, 2000).

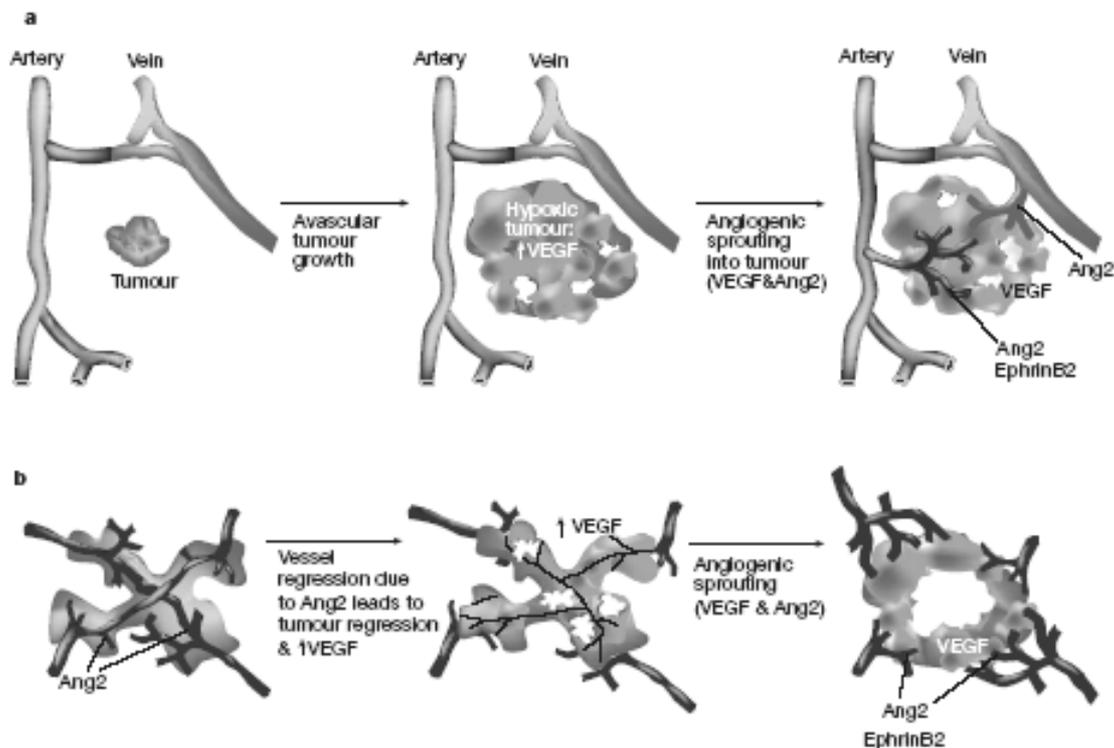


Figura 5: cooption e angiogenesi (da Yancopoulos GD et al, 2000)

In studi successivi l'organizzazione microvascolare viene chiamata con l'acronimo "edvin" ("edge versus inner tumour area"), distinguendo i vasi tumorali che riforniscono i margini dell'invasione, la periferia, da quelli che irrorano l'interno dell'area tumorale. Le aree periferiche sono dunque attraversate da capillari tipici con cellule endoteliali, che derivano dai vasi preesistenti sotto lo stimolo di VEGF e altri fattori di crescita (via dipendente dall'angiogenesi). Al contrario le aree centrali sono rifornite da strutture endoteliali simili a tubi ed a canali pseudovascolari delimitati da cellule tumorali, non endoteliali. Questi spazi avvolti dal tumore e comunemente conosciuti come "vasculogenic mimicry" (imitazione di vasi) sono generati direttamente dalle cellule tumorali piuttosto che attraverso l'espressione di fattori angiogenetici (via indipendente dall'angiogenesi). I due sistemi vascolari sono tra loro in comunicazione. La topografia tumorale appena descritta appartiene in particolare ai tumori solidi che abbiano una componente esofitica. I due sistemi vascolari sono ben rappresentati rispettivamente nella componente endofitica intramurale e in quella esofitica superficiale (Sivridis E et al, 2003).

Dopo molti mesi o anni più tardi, un tumore *in situ* può quindi virare verso un fenotipo angiogenetico, indurre la formazione di nuovi capillari ed iniziare ad invadere i tessuti circostanti. Lo *switch angiogenetico* si instaura a differenti stadi nel pathway della progressione tumorale e dipende dalla natura del tumore e dal suo microambiente; è causato dallo squilibrio tra fattori stimolanti ed inibenti l'angiogenesi all'interno del tumore stesso. Quindi il fenotipo angiogenetico può risultare dalla produzione di fattori di crescita, come il VEGF o l'FGF-2, da parte delle cellule tumorali e/o dalla sottoregolazione dei modulatori negativi, come la trombospondina 1 nei tessuti con vascolarizzazione quiescente. Esperimenti su topi transgenici portatori di tumore spontaneo hanno dimostrato che solo una parte (circa il 10%) delle cellule tumorali acquisisce il fenotipo angiogenetico e che le rimanenti cellule vengono alimentate dai capillari reclutati dalle cellule vicine. In modo simile, nei tumori umani coesistono aree di intensa neovascolarizzazione vicino ad aree dove la perdita di capillari è significativa (Tonini T et al, 2003).

La crescita tumorale e l'invasione dei tessuti è mediata dalle proteasi prodotte dal tumore stesso, che a loro volta stimolano la produzione di fattori di crescita, che vengono liberati da parte delle cellule tumorali, endoteliali ed infiammatorie (mast-cellule e macrofagi) e/o mobilizzati dalla matrice extracellulare. Esistono dunque diversi circuiti di auto-amplificazione che mantengono il fenotipo angiogenetico del tumore (Conti CJ, 2002).

Il tumore sfrutta l'ossigeno che diffonde dai vasi esistenti; quando tale apporto diviene insufficiente l'ipossia che si instaura induce l'aumentata trascrizione del fattore di trascrizione indotto dall'ipossia HIF1a (Birner P et al, 2000) da parte delle cellule tumorali. Questo determina l'aumento della produzione di fattori angiogenetici, i quali funzionano come fattori di crescita e di sopravvivenza altamente specifici per le cellule endoteliali. Tra i vari fattori proangiogenetici, il

VEGF oltre a stimolare la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule endoteliali, aumenta la permeabilità dei vasi sanguigni, permettendo la formazione di un gel extravascolare di fibrina, supporto necessario per la crescita dell'endotelio (Dvorak HF et al, 1987).

In molti tumori, l'angiogenesi è indotta non solo dall'ipossia ma anche o solo da alterazioni genetiche: la perdita di funzionalità di geni oncosoppressori come *VHL*, *p53* e *p16^{INK4a}* o l'attivazione di oncogeni come *ras*, *raf*, *HER2/erbB2 (neu)* e *src* (Conti CJ, 2002) porta ad una aumentata espressione e/o secrezione di VEGF.

La nuova rete capillare tumorale differisce in molti aspetti da quella della maggior parte dei tessuti normali.

In primo luogo, la proliferazione è tumultuosa, con un tasso di replicazione da 50 a 200 volte maggiore rispetto alle cellule endoteliali normali. In secondo luogo, i vasi associati al tumore hanno una struttura deficitaria: sono spazi vascolari con pareti sottili, presentano anomale ramificazioni e terminazioni cieche; somigliano a capillari emolinfatici (BLC); hanno la tendenza a formare sinusoidi e a creare shunts artero-venosi; l'endotelio è incompleto e può mostrare fenestrature e perdita delle giunzioni intercellulari; la membrana basale è tendenzialmente assente o discontinua; mancano le cellule muscolari lisce e sono presenti scarsi periciti; è assente l'innervazione; può esserci fibrosi perivascolare; alcuni spazi vascolari, soprattutto quelli centrali, sono delimitati da cellule tumorali. In terzo luogo, i nuovi vasi sono privi di un meccanismo di controllo locale; manca ad esempio la capacità di adattare il microcircolo alle richieste metaboliche del tumore, probabilmente a causa della perdita delle fibrocellule muscolari lisce e dell'innervazione (Sivridis E et al, 2003)

Inoltre, la perfusione è inefficace; gli shunts artero-venosi, ad esempio, avendo una resistenza molto bassa al flusso, permettono il passaggio di sangue direttamente da arterie a vene, saltando il sistema di scambio capillare; il flusso turbolento rappresenta più del 30% del flusso che giunge al tumore; la microcircolazione tumorale è caratterizzata da periodi di stasi e periodi di ripresa del flusso, a volte in direzione opposta, fenomeno denominato "rigurgito e flusso intermittente", che avviene con una periodicità di 2-3 min e negli esperimenti animali sembra fluttuare con i movimenti respiratori (Sivridis E et al, 2003).

In più, il drenaggio dei fluidi interstiziali è pregiudicato e quindi la pressione interstiziale è elevata; l'aumentata permeabilità vascolare permette lo stravasamento di proteine plasmatiche che costituiscono momentaneamente l'impalcatura per la migrazione delle cellule endoteliali (Tonini T et al, 2003); questo fattore associato alla perdita di circolazione collaterale e all'assenza di una circolazione linfatica intratumorale fanno pensare che questo tipo di circolazione tumorale sia incline al collasso e alla stasi. Infine, all'interno della massa tumorale i vasi sono distribuiti in maniera irregolare,

presentando aree di estrema densità microvascolare (MVD), chiamate “hot spots”, alternate ad aree più povere. Le prime sono tendenzialmente rappresentate alla periferia, ossia a livello del margine di invasione tumorale. Sono presenti inoltre emorragie focali spontanee se le cellule tumorali esprimono VEGF₁₂₁ o VEGF₁₆₅ (Tonini T et al, 2003).

La tappa finale nella progressione di un tumore sono le metastasi. La neovascolarizzazione del tumore primitivo accresce la possibilità che le cellule entrino nel torrente circolatorio per raggiungere altri organi ed è anche fondamentale per la crescita delle metastasi a distanza. La maggior parte delle micrometastasi possiede un alto tasso di necrosi e non è vascolarizzata fino a che le cellule non assumano un fenotipo angiogenetico. Esperimenti nei topi hanno dimostrato che per alcuni tumori, come il carcinoma polmonare di Lewis, lo switch dipende dalla rimozione del tumore primario, che produce un inibitore dell'angiogenesi: l'angiostatina (Holash J et al, 1999). In generale questo non avviene; ad esempio, le metastasi da melanoma B16 non sono influenzate dalla rimozione del tumore primitivo (Streit M, Detmar M, 2003). In questo caso lo switch non dipende dalla riduzione di livelli circolanti di un inibitore, ma dalla capacità delle cellule neoplastiche di produrre fattori angiogenetici (Tonini T et al, 2003).

VEGF e angiogenesi tumorale.

Già si è discusso sulla funzione proangiogenetica del VEGFA e si è accennato in più punti sulla importanza di questo fattore di crescita nella neoangiogenesi tumorale.

Molti tipi di neoplasie umane esprimono il VEGF, spesso con valori elevati (Kerbel R, 2008). L'ipossia caratteristica dei tumori solidi è il principale induttore del VEGF attraverso meccanismi già descritti in precedenza. È comunemente ritenuto che l'effetto del VEGF nella angiogenesi tumorale avviene con meccanismo paracrino dal momento che le cellule tumorali producono il VEGF ma non esprimono il VEGFR2, mentre le cellule endoteliali esprimono il recettore ma non il ligando; tuttavia anche cellule stromali non tumorali contribuiscono alla produzione dei VEGF (Fukumura D et al., 1998). Ciò può spiegare almeno in parte il fatto che i valori plasmatici di VEGF o i suoi valori di espressione nei tessuti tumorali non predicano una risposta terapeutica sull'inibizione del segnale del VEGF (Jubb AM et al., 2006). Alcune cellule tumorali, soprattutto di neoplasie ematologiche, esprimono sia il VEGFA sia il suo recettore con meccanismo autocrino (Dong X et al., 2007) altre esprimono solo il recettore VEGFR-2 intracellulare come per esempio cellule di cancro della mammella (Lee TH et al., 2007).

INIBIZIONE DELL'ANGIOGENESI TUMORALE

Per il trattamento delle patologie neoplastiche vengono oggi utilizzati diversi farmaci chemioterapici. Purtroppo, molti composti hanno una limitata efficacia ed elevata tossicità per i tessuti sani, a causa di problemi di distribuzione, penetrazione e di bassa selettività per le cellule tumorali. L'attività di questi farmaci è ulteriormente limitata dallo sviluppo di farmaco-resistenza da parte delle cellule tumorali. Infatti esse sono un bersaglio che muta rapidamente, per l'instabilità genetica, che porta ad un alto tasso di mutazioni con la selezione e proliferazione di popolazioni cellulari farmaco-resistenti.

Nel 1971, Judah Folkman ha ipotizzato che la crescita dei tumori dipendesse dall'angiogenesi e che la terapia anti-angiogenica potesse rappresentare una buona alternativa per il trattamento dei tumori solidi (Folkman J, 1971 e Folkman J, Cotran R, 1976). Il vantaggio rispetto ai trattamenti citotossici risiede nel fatto che il bersaglio è rappresentato dalle cellule endoteliali in fase proliferativa. Esse sono geneticamente stabili, diploidi, omogenee e le mutazioni spontanee avvengono raramente; hanno un turnover 50 volte maggiore rispetto all'endotelio quiescente ed esprimono diversi marcatori, come $\alpha\beta3$, E-selettine, Tie-2 e VEGFR. Ogni capillare tumorale irrorato da cellule tumorali e le cellule endoteliali associate al tumore, rilasciando fattori di crescita sia in modo autocrino che paracrino, contribuiscono alla proliferazione sia delle cellule endoteliali stesse sia delle cellule tumorali. Di conseguenza l'endotelio attivato rappresenta un bersaglio più specifico rispetto alle cellule tumorali e l'inibizione di un piccolo numero di vasi tumorali può incidere sulla crescita di molte cellule tumorali (Zhi H, Shi-Deng B, 2004).

L'instabilità genomica e l'eterogeneità delle cellule tumorali possono spiegare le osservazioni cliniche secondo cui i pazienti con tumore nello stesso stadio clinico abbiano risposte cliniche alla terapia anti-cancro considerevolmente diverse. Questo dimostra l'importanza di stabilire un profilo angiogenetico nei pazienti con cancro o con altre malattie croniche caratterizzate da disregolazione dell'angiogenesi. Infatti, la densità dei vasi intratumorali (MVD o IVD) è un fattore prognostico in molti tumori solidi, come il cancro della mammella invasivo, del polmone, dell'apparato gastro-intestinale, genito-urinario ed il melanoma maligno (Gasparini G, 1999). In questi tumori è stata riscontrata una correlazione positiva tra l'angiogenesi tumorale ed il rischio di metastasi, recidiva tumorale e decesso.

I farmaci “anti-VEGF”

Il riconoscimento che il pathway stimolati da VEGF è un regolatore chiave dell'angiogenesi ha condotto allo sviluppo di numerosi agenti anti-VEGF quali anticorpi neutralizzanti, recettori solubili del VEGF, e inibitori delle tirosina-chinasi selettive per i recettori VEGFR (Ellis LM e Hicklin DJ, 2008). Dopo risultati positivi nei trial randomizzati e controllati alcuni di essi quali l'anticorpo monoclonale anti-VEGF bevacizumab e gli inibitori della tirosina kinasi del VEGFR sorafenib e sunitinib sono stati approvati per l'uso clinico; in particolare il Bevacizumab per il carcinoma metastatico del colon-retto, per i carcinomi polmonari non a piccole cellule e per il carcinoma metastatico della mammella in combinazione con la chemioterapia. L'inibitore TRK sorafenib è risultato efficace nel carcinoma renale ed epatocellulare avanzati; tuttavia va considerato che gli inibitori delle tirosina chinasi sono selettivi più che specifici e pertanto è possibile che alcuni degli effetti derivino anche dall'inibizione di altri recettori con tirosina kinasi intracellulari per esempio il PDGFR (Ellis LM e Hicklin DJ, 2008).

Nonostante una vastissima sperimentazione in più tipi tumorali l'inibizione del VEGF è risultata efficace perlopiù in associazione alla chemioterapia a garantendo risultati additivi significativi ma non rivoluzionanti la prognosi; solo nel caso di alcune neoplasie come quelle renali, per esempio, si è osservata una maggiore efficacia in monoterapia (Ellis LM e Hicklin DJ, 2008).

Sfortunatamente, infatti, i risultati importanti ottenuti in fase preclinica sui modelli murina non si sono sempre confermati nei trial clinici in cui la vascolatura tumorale, nell'uomo, pare essere molto meno influenzata dalla terapia anti VEGF rispetto agli animali da esperimento. Infatti i risultati dalla sperimentazione umana hanno evidenziato che l'efficacia di tali trattamento è spesso transitoria fornendo aumenti di sopravvivenza di alcuni mesi ma rapida perdita di efficacia del trattamento; inoltre al meglio si osserva un blocco della crescita tumorale o una minima riduzione ma mai effetti più radicali. In questo contesto sia una limitata efficacia intrinseca sia meccanismi di perdita di efficacia del trattamento possono essere considerati, per cui nuovi inibitori dell'interazione VEGFA-VEGFR2 o del suo segnale sono in sperimentazione anche in combinazione tra loro (Bergers G e Hanahan D, 2008).

GAS 6 E ANGIOGENESI

I vasi possono essere un bersaglio dell'asse Gas 6/Axl, essendo entrambe molecole espresse dalle cellule endoteliali (EC) (Manfioletti G et al, 1993 e Manzow S et al, 1996), dai periciti (Collet G et al, 2003) e dalle cellule muscolari lisce (Melaragno MG et al, 1998). La sopravvivenza dei vasi risulta alterata nei topi knock-out per i geni Ark, Rse, Mer (Prieto AL et al, 1999).

Attivando programmi genetici specifici e parzialmente sovrapposti, le cellule endoteliali giocano un ruolo chiave in molti processi, come la regolazione del tono vasale, il metabolismo lipidico, l'ematopoiesi, l'infiammazione, il riconoscimento dell'antigene, la trombosi, l'emostasi e l'angiogenesi (Melaragno MG et al, 1998).

In un recente studio, è stato indagato il ruolo dell'asse Gas 6/Axl nell'angiogenesi, dimostrando che questo asse può inibire l'attivazione delle cellule endoteliali dipendente da VEGFR-2 (Gallicchio M et al, 2005). Infatti in vitro Gas6 è risultato inibire in modo dose-dipendente l'effetto chemiotattico di VEGF-A₁₂₁. Tale effetto è stato inibito con proteina Ig solubile di fusione contenente il dominio extracellulare di Axl (Axl-Ig) o di in Ab monoclonale diretto verso l'estremità N-terminale di Axl (α Axl-N), pertanto Axl è il recettore TK stimolato da Gas6. Gas6 induce l'autofosforilazione nei residui tirosinici di Axl a concentrazioni di 1 ng/mL. Gas 6 non ha invece influenzato l'attività chemiotattica dell'FGF-2 e dell'HGF (Gallicchio M et al, 2005).

Le cellule endoteliali coltivate in Matrigel, una matrice naturale di membrana basale, spontaneamente differenziano in geometriche reti tubulari, indipendentemente dalle mitosi cellulari. Le cellule sono guidate a migrare dalla presenza di VEGF-A, che agisce soprattutto in modo paracrino/autocrino. Gas6 è risultato interferire con il potenziale morfogenetico delle cellule endoteliali su Matrigel in modo dose-dipendente con massimo effetto inibitorio a 80-100 ng/ml (cellule endoteliali incapaci di formare cordoni interconnessi con nodi). Ig-Axl ha revertito l'effetto di Gas6 (Gallicchio M et al, 2005). Inoltre, *in vivo*, Gas6 è risultato efficace nell'inibire la formazione di vasi nel modello della membrana corioallantoidea di pollo (CAM). Gas6 usato a 20 ng/spugna ha inibito l'attività di VEGF-A₁₆₅, ma non quella di FGF-2. L'effetto di Gas6 è stato antagonizzato con Axl-Ig (Gallicchio M et al, 2005).

Gas6 è risultato inibire l'autofosforilazione del VEGFR-2 indotta dal VEGF-A. Tale evento avviene dopo la dimerizzazione del VEGFR-2 dipendente dal VEGF-A. La pre-incubazione delle cellule endoteliali con Gas6 a 1 ng/ml comporta una marcata inibizione dell'autofosforilazione del VEGFR-2 immunoprecipitato. La presenza di VEGF-A₁₆₅ determina la fosforilazione di Axl. Inoltre Gas6 non è risultato competere per il legame con il VEGFR-2 con il VEGF-A₁₆₅.

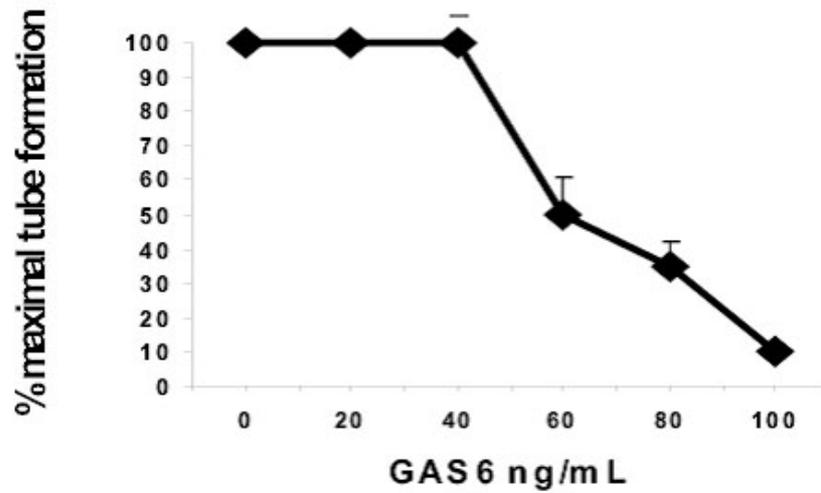


Figura 6: inibizione dose-dipendente indotta da Gas 6 sulla tubulogenesi (da Gallicchio M et al, 2005).

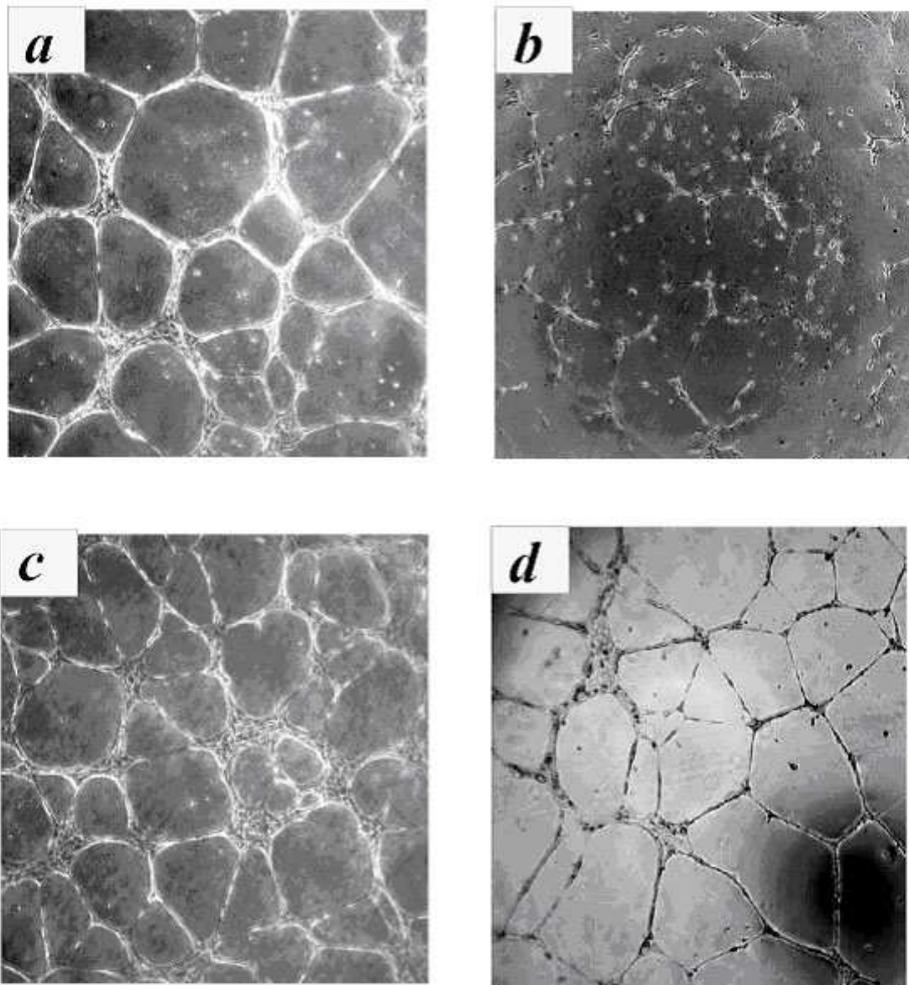


Figura 7: Aspetto morfologico delle cellule endoteliali incubate in Matrigel per 12 ore in presenza del mezzo di crescita M199 contenente 0.5% FCS (a) a cui è stato aggiunto Gas 6 (100 ng/mL) (b), Gas 6 e Axl-Ig (1 μ g/mL) (c), o Axl-Ig da solo (d) (da Gallicchio M et al, 2005).

Gas6 è risultato inoltre favorire la fosforilazione in tirosina della Shp-2 e la sua associazione con Axl. Shp-2, proteina citosolica tirosina fosfatasi, è stata implicata in vie di trasduzione del segnale innescate dal VEGF-A: essa defosforila VEGFR-2 *in vitro*. Shp-2 potrebbe essere responsabile del segnale inibitorio mediato dall'asse Gas 6-Axl sulle attività del VEGF-A. tale ipotesi è avvalorata dal fatto che l'espressione nelle cellule endoteliali di un mutante di Shp-2 C/S (da Cys a Ser), inattiva a livello catalitico, non ha modificato la fosforilazione di Axl dipendente dal Gas6, ma è stata capace di sopprimere la fosforilazione di Shp-2 innescata dal Gas6 (Gallicchio M et al, 2005).

MODELLI DI STUDIO DELL'ANGIOGENESI

Una delle più importanti sfide tecniche nello studio dell'angiogenesi è la selezione dell'appropriato modello di analisi. Esiste una grande varietà di metodi descritti, sia *in vivo* che *in vitro*. E' stato dimostrato che è necessario usare una combinazioni di modelli per identificare gli eventi molecolari e cellulari dell'angiogenesi e tutti gli effetti delle proteine testate. Nonostante la migrazione, proliferazione e differenziazione delle cellule endoteliali siano centrali nel processo angiogenetico, vi sono anche coinvolte le cellule di supporto (i periciti, le cellule muscolari lisce, i fibroblasti e, nel caso dei tumori, le celluleneoplastiche), la matrice extracellulare prodotta dalle cellule endoteliali, le vicine cellule mesenchimali e la circolazione sanguigna con i suoi elementi cellulari e umorali. Non esiste attualmente *in vitro* un modello che simuli questo processo così complesso. *In vivo*, invece, sono presenti tutti i componenti del processo, ma vi sono limitazioni legate allo specifico microambiente, ai siti di inoculo, alle specie usate e al modo di somministrazione della sostanza da testare. I metodi di indagine ed i modelli di studio dell'angigenesi con i rispettivi vantaggi e svantaggi sono riportati nella tabella 2 (Staton CA et al, 2004).

I modelli dell'angiogenesi *in vitro* si focalizzano sulla misurazione della migrazione, proliferazione e tubulizzazione da parte delle cellule endoteliali in risposta agli agenti esogeni stimolatori o inibitori. Un problema con il modello delle cellule endoteliali *in vitro* è che esse non hanno sempre caratteristiche analoghe dal punto di vista morfologico, ma dimostrano differenze fenotipiche. Le differenze sono state ben identificate tra quelle derivate dai grossi vasi, come le cellule endoteliali della vena ombelicale (HUVEC) e quelle di origine microvascolare, come le cellule endoteliali microvascolari del derma umane (HuDMEC) (Staton CA et al, 2004).

Oltre alle differenze strutturali esistono differenze organo-associate, in base al tessuto e dalla specie di origine, che non possono essere ignorate. In più, un'altra limitazione è che *in vitro* le cellule endoteliali possono comportarsi in modo differente a seconda delle condizioni colturali. Sebbene i saggi *in vitro* siano rapidi, prontamente quantificabili e consistentemente riproducibili, essi non permettono di studiare le interazioni fisiologiche complesse che avvengono *in vivo*. Inoltre, la valutazione degli effetti indiretti di un composto (che spinge le cellule non endoteliali a produrre a loro volta un composto che agisce poi sulle cellule endoteliali) è difficile da riprodurre. Dovunque possibile, i saggi *in vitro* dovrebbero essere svolti usando cellule endoteliali provenienti da più di una sorgente, o ancora più importante, essere seguiti da uno o più saggi *in vivo* (Staton CA et al, 2004).

La valutazione *in vivo* (tabella 3) degli agenti che modulano l'angiogenesi è un passo successivo importante per lo sviluppo di farmaci. Infatti, alcuni studi hanno dimostrato che un composto che influisce sulla proliferazione, migrazione e differenziazione cellulare *in vitro* non necessariamente è in grado di regolare l'attività delle cellule endoteliali *in vivo*. Il modello "Plug di Matrigel" fornisce un microambiente naturale per l'angiogenesi; Matrigel è una matrice extracellulare prodotta dal sarcoma murino di Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), costituita in modo predominante da laminina (60%), collagene IV (30%), nidogeno (5%) eparan-solfati, proteoglicani (3%) ed entactina (1%). In questa matrice le cellule endoteliali coltivate *in vitro* attecchiscono e rapidamente formano tubuli (in 4-12 ore). Recentemente è stata sviluppata una seconda forma di Matrigel in cui sono stati ridotti in maniera marcata i livelli di citochine e fattori di crescita. Questa seconda preparazione evita i problemi associati alla forte stimolazione che le cellule endoteliali subiscono nel primo caso. Il Matrigel è allo stato liquido a 4°C e solidifica rapidamente a temperature superiori. Questa caratteristica peculiare lo rende particolarmente adatto all'inoculo in animali da esperimento; allo stato liquido può essere agevolmente mescolato ai reagenti da saggiare nel corso dell'esperimento ed una volta iniettato sottocute, solidifica rapidamente a costituire una massa omogenea, detta "plug" che può essere agevolmente asportata dopo il sacrificio dell'animale al termine dell'esperimento. I limiti del Matrigel risiedono nel fatto che è costoso e richiede tempo e numerosi esperimenti per la messa a punto (Staton CA et al, 2004).

Altri modelli *in vivo* molto promettenti sono il topo definito "Angiormouse", utilizzato per impiantare linee cellulari transfettate con GFP, il "GFP Mouse" possiede un gene che esprime una proteina con fluorescenza verde; le reti vascolari invece appaiono scure in campo verde; il metodo permette una visualizzazione non invasiva dell'angiogenesi e soprattutto in tempo reale. Lo "Zebrafish", infine, è un piccolo pesce tropicale; gli embrioni transgenici per una proteina fluorescente verde permettono una rapida valutazione dell'angiogenesi, anche se l'allevamento è complesso e costoso (Staton CA et al, 2004).

In conclusione, è essenziale che le analisi *in vitro* siano validate da più analisi *in vivo*. Gli attuali modelli *in vivo* presentano difficoltà nella messa a punto, sono molto costosi e richiedono tempo. Sono, inoltre, inclini ad alta variabilità e spesso difficili da quantificare (nonostante le nuove tecniche computerizzate di imaging). Nonostante queste limitazioni risultano indispensabili poiché, come detto, solo *in vivo* è possibile avere un modello completo di tutti gli elementi coinvolti nel complesso processo angiogenetico (Staton CA et al, 2004).

Tipo di analisi	Specifica analisi	Vantaggi	Svantaggi
Proliferazione	MTT	-Misura del numero delle cellule	-Non necessariamente cellule proliferanti -Non misura la tossicità della sostanza
Proliferazione	Incorporazione della timidina	-Misura la replicazione di DNA	-Utilizza radiazioni -Non misura la tossicità della sostanza
Proliferazione	BrdU	-Misura la replicazione di DNA -Non usa radiazioni	-Non misura la tossicità della sostanza
Proliferazione	Analisi del ciclo cellulare	-Misura l'apoptosi e la tossicità della sostanza	-Le cellule devono essere in sospensione per l'analisi
Migrazione	Camera di Boyden	-Misura la migrazione in base al gradiente -Estremamente sensibile a piccole variazioni di concentrazione	-Difficile tecnicamente -Difficoltà a mantenere i gradienti trans filtro -Difficoltà ad ottenere una accurata conta cellulare -Dispendiosa di tempo
Migrazione	Traccia fagocinetica	-Misura totale delle cellule in movimento -Misura direzionale degli effetti della sostanza	-Solo un piccolo numero di cellule studiate -Substrato innaturale per la migrazione
Migrazione	Riparazione ferite	-Misura il tasso di migrazione delle cellule endoteliali	-Quantificazione piuttosto arbitraria -Problemi tecnici nell'evitare condizioni identiche di confluenza
Differenziazione	Saggio Matrigel	-Le cellule endoteliali vengono spinte nel pathway differenziativo -Formazione di strutture simil tubulari -Rapido	-La formazione del lume è dibattuta -Anche cellule non endoteliali formano tubuli -Pattern omogeneo di lunghezza dei tubuli
Differenziazione	Gel 3D	-Mima strettamente la situazione in vivo -I tubuli si formano in tutte e tre le dimensioni	-Periodo lungo di tempo -Problemi nel quantificare le strutture 3D
Differenziazione	Co-coltura (cellule endoteliali e stromali)	-I tubuli hanno un lume -Pattern di lunghezza dei tubuli più eterogeneo -Molto vicino alla situazione <i>in vivo</i>	-Periodo lungo di tempo -Interazioni non definite tra le cellule endoteliali e le altre cellule
Coltura su organi	-anello aortico di ratto -arteria carotide porcina -vena del disco placentare -espianto osseo di feto murino	-Mimano la situazione <i>in vivo</i> -Includono cellule circostanti e matrice	-Difficoltà nella quantificazione -Non rappresentativo dell'ambiente microvascolare

Tabella 2: Metodi di analisi in vitro: vantaggi e svantaggi (Staton CA et al, 2004).

Metodo	Vantaggi	Svantaggi
Impianto spugna	-Le cellule endoteliali non sono in proliferazione all'inizio dell'analisi -Economica -Tecnicamente semplice	-Dispendiosa di tempo -Una risposta immune aspecifica può portare ad una risposta angiogenica -La composizione della spugna è varia, difficile paragone tra gli studi
Plug di Matrigel	-Non artificiale, fornisce un microambiente più naturale per l'angiogenesi	-Costoso -Dispendioso di tempo
Analisi CAM (membrana corion-allantoidea di embrione di pollo)	-Tecnicamente semplice -Economica -Adatto per screening su larga scala	-Molto sensibile alla tensione di ossigeno -Difficile visualizzazione dei nuovi capillari a causa della preesistente rete vascolare -La risposta immune può mascherare la nuova vascolarizzazione
Analisi corneale	-Affidabile	-Costosa -Tecnicamente difficile -eticamente discutibile
Modello dorsale di sacco d'aria	-Tecnicamente semplice -Ambiente naturale in cui studiare i vasi sanguigni	-Invasivo -Difficile visualizzazione dei nuovi capillari a causa della preesistente rete vascolare
Analisi con camera	-Permette la crescita 3D dei vasi in un periodo relativamente lungo -Riduce il numero di topi usati	-Invasivo -Tecnicamente difficile -Costoso (in conigli) -Comporta atti chirurgici
Modelli tumorali	-Studiano anche gli effetti farmacocinetici -Possibilità di studi a lungo termine	-L'ambiente tumorale dipende dal sito di crescita (ortotopico o subcutaneo) -Lo studio in tempo reale non è possibile (sacrificio animali)
Angiomouse	-Visualizzazione non invasiva -Immagini di angiogenesi in tempo reale	-La sensibilità può essere limitata dall'assorbimento di luce da parte dei tessuti circostanti (soprattutto la cute)
Zebrafish	-Analisi relativamente veloce (6-12h) -Quantitativo -Il disturbo della vascolarizzazione non danneggia l'embrione	-Non indica l'esatto punto della cascata angiogenetica in cui avviene la rottura -Costoso per l'allevamento -Non distingue tra gli effetti citotossici e l'inibizione originaria

Tabella 3: Metodi di analisi “in vivo”: vantaggi e svantaggi (Staton CA et al, 2004).

SCOPO DEL LAVORO

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

È inoltre stato dimostrato che VEGF viene iperespresso da diversi tipi di tumori umani e che la sua iperespressione favorisce la resistenza al trattamento citotossico, sia chemio che radioterapico e la crescita tumorale e il potenziale invasivo-metastatizzante. Questo ha portato a considerare la terapia antiangiogenica come elemento importante nel trattamento di molte neoplasie (Folman J, 1995; Kerbel R, 2008).

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

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

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

Gli obiettivi del progetto saranno quindi i seguenti:

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

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

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

Tale obiettivo verrà valutato analizzando l'effetto di Gas6 sulla neoangiogenesi indotta mediante impianto diretto di cellule tumorali wild type (wt) e trasfettate per overesprimere Gas6

singeniche con i topi C57BL/6 e inoculo del surnatante da coltura cellulare delle stesse nel matrigel plug. Inoltre si valuterà l'effetto di Gas6 sia somministrato nel plug di matrigel sia per via parenterale.

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

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

MATERIALI E METODI

a) esperimenti in vitro.

Materiali

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

Metodi

Raccolta surnatante di cellule neoplastiche umane esprimenti VEGF

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

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

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

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

Per prima cosa si procede alla fissazione delle cellule, togliendo il terreno, lavando ogni pozzetto con washing buffer, aggiungendo 1 ml di fissativo (etanolo al 70%, conservato a -20°C ed utilizzato freddo) ed incubando a temperatura ambiente per 30 minuti. Successivamente si aspira il fissativo e si aggiunge l'anticorpo primario *mouse anti-human CD31* in blocking buffer e si incuba per 60 minuti a 37°C . Quindi si aggiunge l'anticorpo secondario (*goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate*), diluito in blocking buffer. Si incuba ancora per 60 minuti a 37°C . Dopo ogni passaggio si lavano i pozzetti per tre volte con H_2O distillata a temperatura ambiente.

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

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

b) esperimenti in vivo

Animali

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

Sostanze e reagenti

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

Cellule

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

Materiale di consumo ed apparecchiature

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

Preparazione surnatante di cellule neoplastiche murine.

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

Saggio di angiogenesi con matrigel plug.

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

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

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

Il matrigel allo stato liquido viene addizionato con le molecole favorevoli all'angiogenesi (rmVEGF 100 ng/ml, surnatante cellule B16F10 alla diluizione 1:5 - Valutazioni preliminari istologiche e con dosaggio dell'Hb su plug di matrigel hanno evidenziato un'intensa vascolarizzazione, superiore a quella indotta utilizzando esclusivamente VEGF, pertanto il surnatante è stato testato nel plug di matrigel utilizzando una diluizione 1:5 in matrigel per una concentrazione di VEGF circa di 20 ng/ml) in presenza/assenza della proteina Gas6 (rmGas6 250 ng/plug). Ogni esperimento viene condotto in presenza degli opportuni controlli negativi (solo matrigel e solo rmGas6). Le singole provette vengono agitate mediante Vortex, in modo da rendere omogenea la diffusione dei diversi fattori nella matrice. Aliquote di 350 μl (primi 3 esperimenti) quindi di 500 μl (tutti gli esperimenti successivi) dei diversi preparati di Matrigel vengono trasferite mediante aspirazione molto lenta, per

non generare bolle, in siringhe da 1 ml dotate di ago 25 Gauge, pre-refrigerate a 4°C. Le siringhe vengono dotate di un codice e poste in ghiaccio in attesa dell'inoculo.

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

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

Saggio di angiogenesi con matrigel plug utilizzando linee cellulari tumorali.

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

Il matrigel viene preparato come descritto sopra.

Dopo tripsinizzazione e lavaggio in PBS previa conta con emocitometro 350 cellule B16F0 vengono risospese in 100 µl di RPMI e successivamente addizionate a 400 µl di matrigel liquido a 4 °C in provette sterili da microcentrifuga in presenza o assenza di rmGas6 250 ng/plug. Opportuni controlli (solo matrigel e rmGas5 250 ng/plug vengono approntati). Quindi il contenuto viene aspirato in siringhe da 1 ml con ago da 25 gauge prerrefrigerate a 4°C. le siringhe vengono quindi lasciate in ghiaccio fino all'inoculo.

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

Quantificazione della neoangiogenesi.

Tecnica istopatologica.

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

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

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

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

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

0: assenza o rare cellule

1: presenza di cellule non organizzate

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

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

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

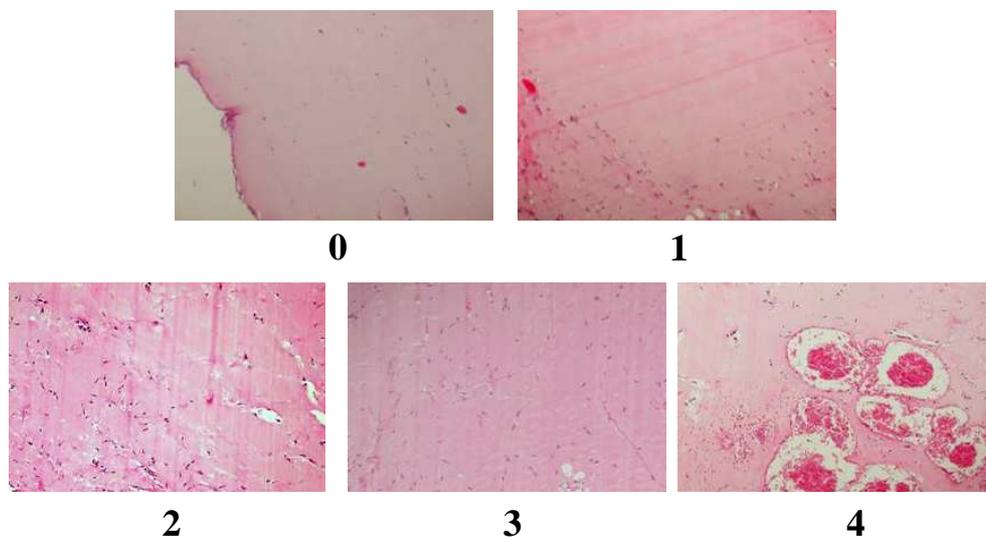


Figura 8. Esempio della applicazione della classificazione sopra descritta.

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

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

Tecnica di dosaggio dell'emoglobina.

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

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

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

Analisi statistica.

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

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

Reagenti

- Plasmide pCMV-SPORT6 contenente il gene *gas6* murino (*mgas6*), clonato tra gli enzimi di Sal I – Not I del “Multiple Cloning site” (MCS).
- Plasmide pcDNA 3.1 (+) (INVITROGEN - USA) con gene per resistenza ad ampicillina e geneticina.
- Enzimi di restrizione ECOR I e NOT I (NEW ENGLAND BIOLABS, USA).
- Agarosio (BIO-RAD - USA).
- Tampone acetato TAE (reagenti per 1 litro di soluzione: 40 mM TRIS, 5mM NaAc, 1 mM EDTA).
- Kit di estrazione DNA da gel di agarosio “NucleoSpin Extract 2 in 1” (MACHEREY-NAGEL - Germania).
- Enzima T4 DNA LIGASI (CLONTECH – USA).
- Batteri *Escherichia Coli* competenti DH5- α (Invitrogen, USA).
- “SOB Medium” (reagenti per 1 litro di soluzione: 20 g di Bacto-Peptone; 5 g di Bacto Yeast Extract; 0,5 g di NaCl; 10 ml di KCl 250 mM; 5 ml di MgCl₂ 2 M) utilizzato per la crescita dei batteri.
- Ampicillina (IBIMICYN - Milano) alla concentrazione di 100 μ g/ml.
- Piastre di Petri da 9 cm per batteri (Bibby Sterilin - Milano).
- Kit per lisi alcalina di batteri, estrazione e purificazione di DNA “NucleoBond Nucleic Acid Purification Tools” (CLONTECH - USA).

Metodi

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

Quindi si procede alla trasformazione dei batteri competenti (*Escherichia Coli* DH-5 α). Per ogni reazione vengono utilizzate aliquote di 50 μ l di batteri DH-5 α pari a 1×10^5 cfu (Colony Forming Unit) e vengono aggiunti in queste ultime aliquote, 5 μ l di reazione di ligasi. La soluzione così ottenuta viene lasciata in ghiaccio per 20 minuti. In seguito viene effettuata la procedura “HEAT SHOCK”, che consiste nell’incubare le provette a 42° C per 2 minuti e poi successivamente in ghiaccio per un altro minuto. In seguito a questa procedura, è stato aggiunto alle stesse provette 1 ml di “SOB Medium” riscaldato a 37° C e le cellule sono state lasciate crescere in un agitatore a 37° C per 45 minuti a 300 giri. Quindi le provette, contenenti la sospensione di batteri vengono centrifugate per 3 minuti a 4000 giri; dopodiché il sedimento ottenuto viene risospeso nel SOB restante dopo l’eliminazione del surnatante, e la sospensione che ne risulta viene dispersa su piastre di Petri da 9 cm di diametro contenenti “SOB Medium” + BACTO-AGAR all’1% e con l’antibiotico ampicillina alla concentrazione finale selettiva di 100 μ g/ml. Le piastre così ottenute vengono incubate a 37° C per tutta la notte e il giorno dopo si verifica visivamente la crescita delle colonie. Le colonie presenti vengono raccolte isolatamente con un puntale sterile e trasferite in recipienti falcon sterili con 5 ml di “SOB Medium” (Mini-Prep) addizionato dell’antibiotico ampicillina alla concentrazione selettiva di 100 μ g/ml. Le aliquote sono lasciate crescere a 37° C in un agitatore a 300 giri per tutta la notte. Il giorno successivo si procede alla lisi alcalina dei batteri con apposito kit per mini prep “NucleoBond Nucleic Acid Purification Tools”. Il DNA plasmidico estratto è sottoposto a taglio con enzimi di restrizione precedentemente utilizzati per verificare l’avvenuto clonaggio (liberazione del gene *mgas6*). Successivamente i batteri delle colonie risultate positive dopo la mappa di restrizione, sono fatti crescere in 200 ml di SOB Medium (Maxi-Prep) sempre con AMPICILLINA alla concentrazione precedente per ottenere maggiori quantità di DNA plasmidico (estratto dai batteri come per le mini prep). Infine il DNA plasmidico amplificato di ogni clone è stato sottoposto a sequenziamento per verificare il posizionamento “in frame” del gene. Sono stati quindi identificati ed isolati diversi cloni di pcDNA 3.1 (+) + “mGas6” tutti contenenti il gene completo orientato “in frame”.

Trasfezione della linea cellulare B16F0 con plasmide di espressione clonato con il gene mGas6.

Reagenti:

- Geneticina 2000 μ g/ml (MP biomedicals)
- Enzima di restrizione PVU I (New England Biolabs)
- Kit per lisi alcalina maxi-prep (NucleoBond, Clontech).

- Linea cellulare B16F0 (melanoma cutaneo murino non metastatizzante) (cortesemente donata dal prof. Kairbaan M. Hoidivala-Dilke, St. Thomas Hospital, London, U.K.);
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (SIGMA-ALDRICH – St. Louis, MO, USA)
- Lipofectamina DOTAP (Roche)
- HEPES Buffer

Prima di eseguire la trasfezione viene verificato che le cellule B16F0 non siano resistenti alla geneticina, antibiotico usato per selezionare i cloni dopo la trasfezione. 100000 cellule B16F0 vengono piastrate in 2 ml DMEM + 10% siero in piastre multiwell da 6 pozzetti e in con concentrazioni differenti di antibiotico (0, 250, 500, 750, 1000, 2000 µg/ml). Dopo 15 gg viene valutata la concentrazione di antibiotico più bassa che non permetta più la crescita cellulare. Tale concentrazione è risultata 2000 µg/ml.

I batteri contenenti il plasmide clonato vengono amplificati dapprima in 20 ml di SOB medium modificato contenente l'antibiotico di selezione ampicillina overnight in incubatore basculante. Quindi 10 ml di SOB con batteri preamplificati vengono fatti crescere in 200 ml dello stesso terreno di crescita overnight nelle condizioni sopra indicate. Quindi il terreno contenente i batteri viene centrifugato a 6000 g per 15' a 4°C. Quindi il plasmide viene estratto con il metodo della lisi alcalina con kit apposito per maxi-prep (NucleoBond, Clontech). Il plasmide ottenuto viene risospeso in acqua deionizzata. Previo controllo della concentrazione allo spettrofotometro, viene eseguita la linearizzazione del plasmide con taglio enzimatico con l'enzima di restrizione PVUI a 37°C per 60'. Dopo aver verificato l'avvenuto taglio su gel di agarosio, l'enzima di restrizione viene inattivato (20' a 80°C).

Vengono quindi piastrate 100000 cells/well in 2 ml DMEM + 10% siero in MW6. Le cellule vengono lasciate 24h in incubatore affinché possano aderire.

Si procede alla trasfezione trasferendo in MW6 di polistirene, per ogni well o 2,5 µg di DNA plasmidico vuoto 2,5 µg di plasmide clonato e una soluzione di DOTAP e HEPES Buffer. Dopo incubazione di 20' a temperatura ambiente, si aspira il terreno di trasfezione, si eseguono 3 lavaggi con DMEM senza siero, quindi si aggiunge 1 ml per well di DMEM + 1% siero con antibiotico di selezione geneticina 2000 µg/ml e si lascia in incubatore per 6h. Quindi si sostituisce il terreno con DMEM + 10% siero e l'antibiotico di selezione. Un well viene lasciato per il controllo di selezione (cellule non trasfettate).

Dopo 7 giorni le cellule vengono ripiastrate in MW6 con diluizione progressiva per ottenere singoli cloni sempre in terreno di selezione. Quando i cloni risultano visibili a occhio nudo, vengono isolati

con un puntale sterile e ripiastrati in MW24 con 500 μ l di terreno di selezione. Quando i singoli cloni che sopravvivono arrivano a confluenza, vengono amplificati separatamente per analisi del lisato cellulare in western blot per valutare l'espressione proteica di gas6. I cloni che esprimono la proteina vengono congelati in azoto.

RISULTATI

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

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

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

TECNICA ISTOLOGICA.

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

Analizzando le medie degli scores istologici, si è evidenziata una modesta risposta angiogenetica nei controlli negativi ($1,4 \pm 0,8$) sostanzialmente invariata in presenza di Gas6 250 ng/plug ($1,5 \pm 0,9$). In presenza di VEGF, alla concentrazione di 100 ng/ml, si è osservato come atteso un'incremento dello score medio di angiogenesi ($3,0 \pm 0,9$). Gas6 è risultato efficace nell'inibire l'angiogenesi VEGF mediata, con netta riduzione dello score ($2,1 \pm 1,0$). (Figura 8a). Tale riduzione è statisticamente significativa (Test post-hoc di Tukey, VEGF vs tutti i gruppi $p < 0,05$, gli altri confronti n.s.).

Analizzando la distribuzione di frequenza degli score bassi (< 2), intermedi (≥ 2 e < 4) e alti (≥ 4) con test χ^2 si osservano più frequentemente scores alti nel gruppo VEGF rispetto agli altri gruppi ($p < 0,05$). Inoltre non vi è alcuna differenza tra gli scores del gruppo VEGF+Gas6 rispetto ai controlli negativi. Figura 8b

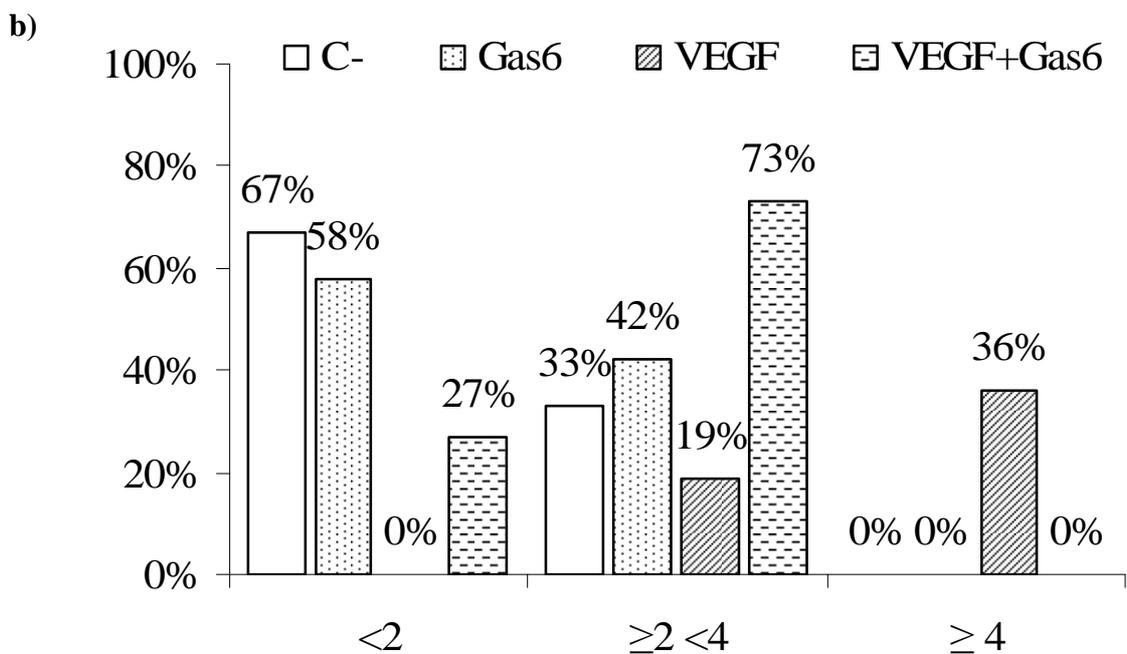
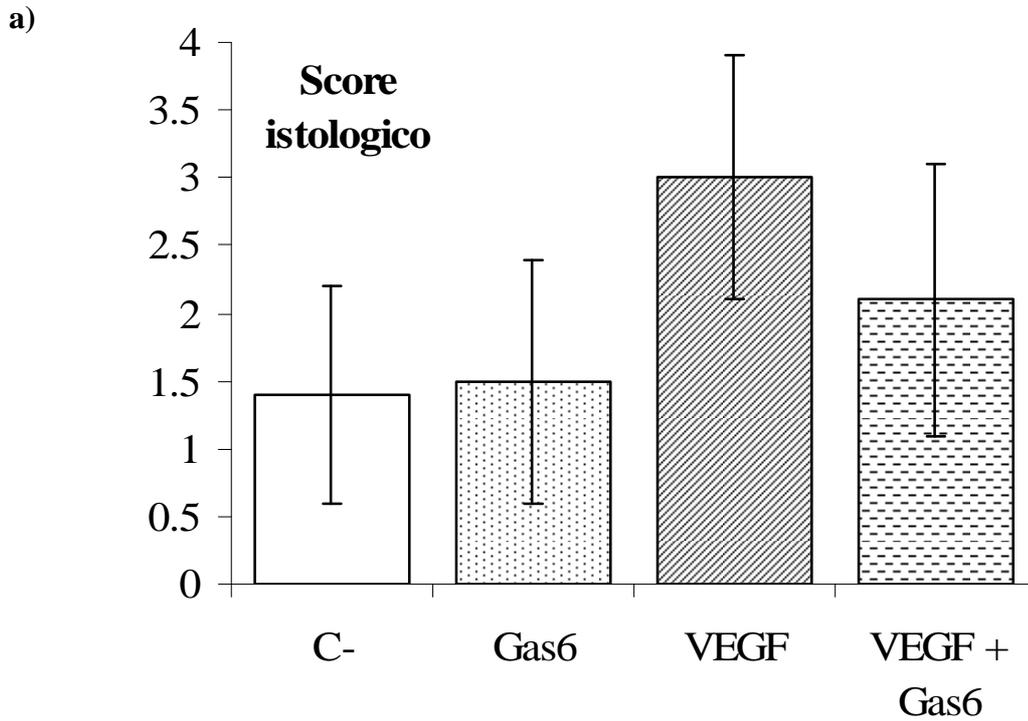


Figura 8. Effetto di Gas6 su angiogenesi VEGF dipendente. Indagine istologica. a) il grafico presenta le medie e le deviazioni standard degli score istologici dei vari gruppi considerati. b) Il grafico rappresenta la distribuzione di frequenza degli score bassi (<2), intermedi ≥ 2 e < 4, alti ≥ 4 tra i vari gruppi considerati.

TECNICA DI DOSAGGIO DELL'EMOGLOBINA

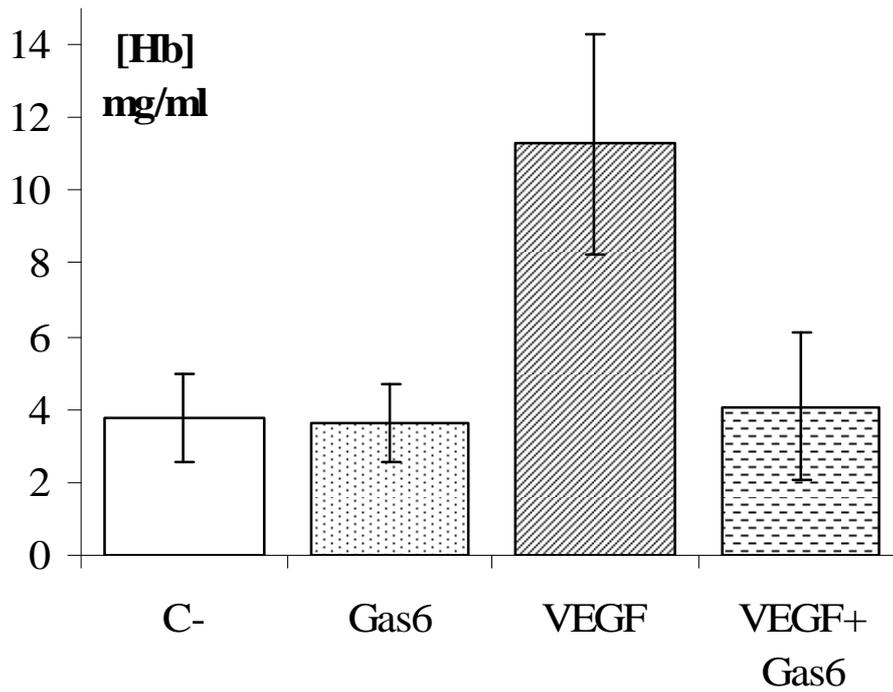
Abbiamo quindi verificato i risultati ottenuti con la valutazione istologica utilizzando la metodica di quantificazione della angiogenesi VEGF indotta nel plug di matrigel attraverso la quantificazione dell'emoglobina nella massa, espressa in concentrazione in rapporto al volume della stessa.

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

Abbiamo confermato che Gas6 alla concentrazione di 250 ng/plug è risultato efficace nell'inibire l'angiogenesi VEGF indotta. La concentrazione media di Hb è risultata essere di 3.8 ± 1.2 mg/ml per il controllo negativo solo matrigel e 3.6 ± 1.0 per il controllo negativo matrigel + Gas6. In presenza di VEGF la concentrazione di Hb è risultata di 11.3 ± 3.0 mentre in presenza di VEGF + Gas6 di 4.1 ± 2.0 (Figura 9). Pertanto Gas6 ha determinato una riduzione del $74 \pm 13\%$ della concentrazione di emoglobina nei plug di matrigel. Tale riduzione è risultata statisticamente significativa (Test post hoc di Tukey, VEGF vs tutti i gruppi $p < 0.0002$). Gli altri confronti non sono risultati statisticamente significativi (figura 9 a e b).

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

a)



b)

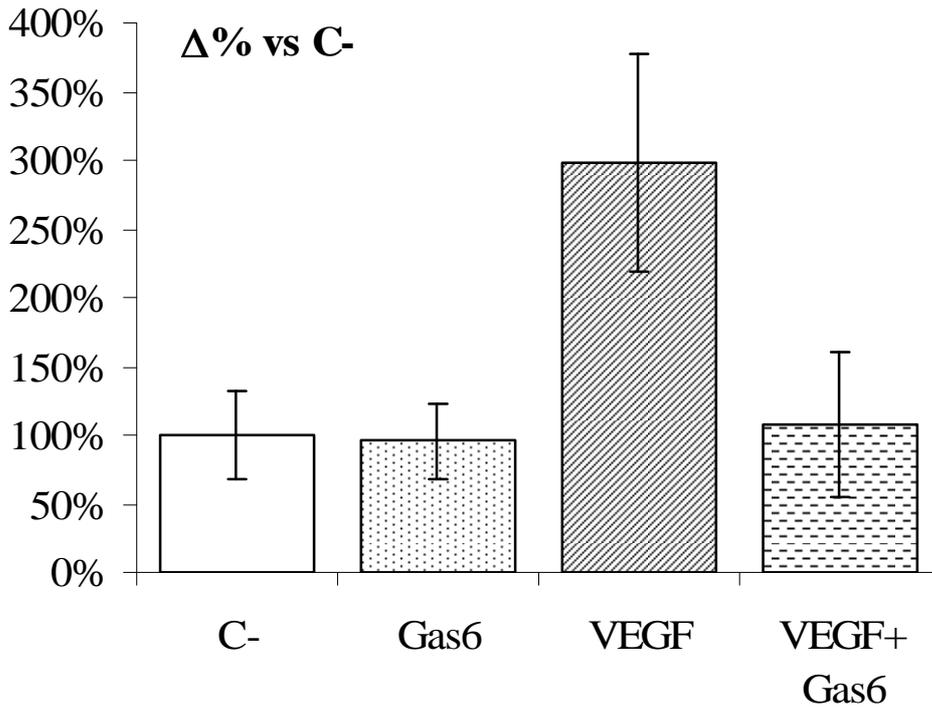


Fig.9 Effetto di Gas6 su angiogenesi VEGF dipendente. Dosaggio Hb.

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

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

Abbiamo studiato l'effetto della proteina Gas6 sull'angiogenesi VEGF-dipendente in un modello umano *in vitro*, in cui le cellule endoteliali umane sono coltivate con fibroblasti umani e vengono stimulate aggiungendo al medium di coltura attivatori ed inibitori della angiogenesi. Sono stati condotti n°3 esperimenti replicati con n°3 casi in replicato per ciascun esperimento. E' stato valutato l'effetto di rhGas6 100 ng/ml nell'inibizione della neoangiogenesi indotta da rhVEGF (2 ng/ml).

Come si può notare nella figura 10, dopo colorazione immunostochimica con anticorpi anti-CD-31, nei pozzetti di controllo sono presenti piccole isole di cellule endoteliali sparse nella matrice, che tendono spontaneamente ad organizzarsi in strutture tubulari lineari ma non formano aggregati (**a**). Nei pozzetti in cui al terreno è stato aggiunto il VEGF, rispetto al controllo, si osservano strutture lineari vascolari in formazioni più evidenti e con maggiore densità; sono presenti, inoltre, numerosi foci di aggregazione di strutture tubulari (**b**). In presenza di Gas6 100 ng/ml si osserva una inibizione del processo angiogenetico VEGF dipendente (**c**), con raggruppamenti tubulari organizzati e con densità dei tubuli neoformati inferiore rispetto a quanto osservato per il VEGF; quadro simile al controllo non trattato o alla combinazione VEGF e suramina (**d**).

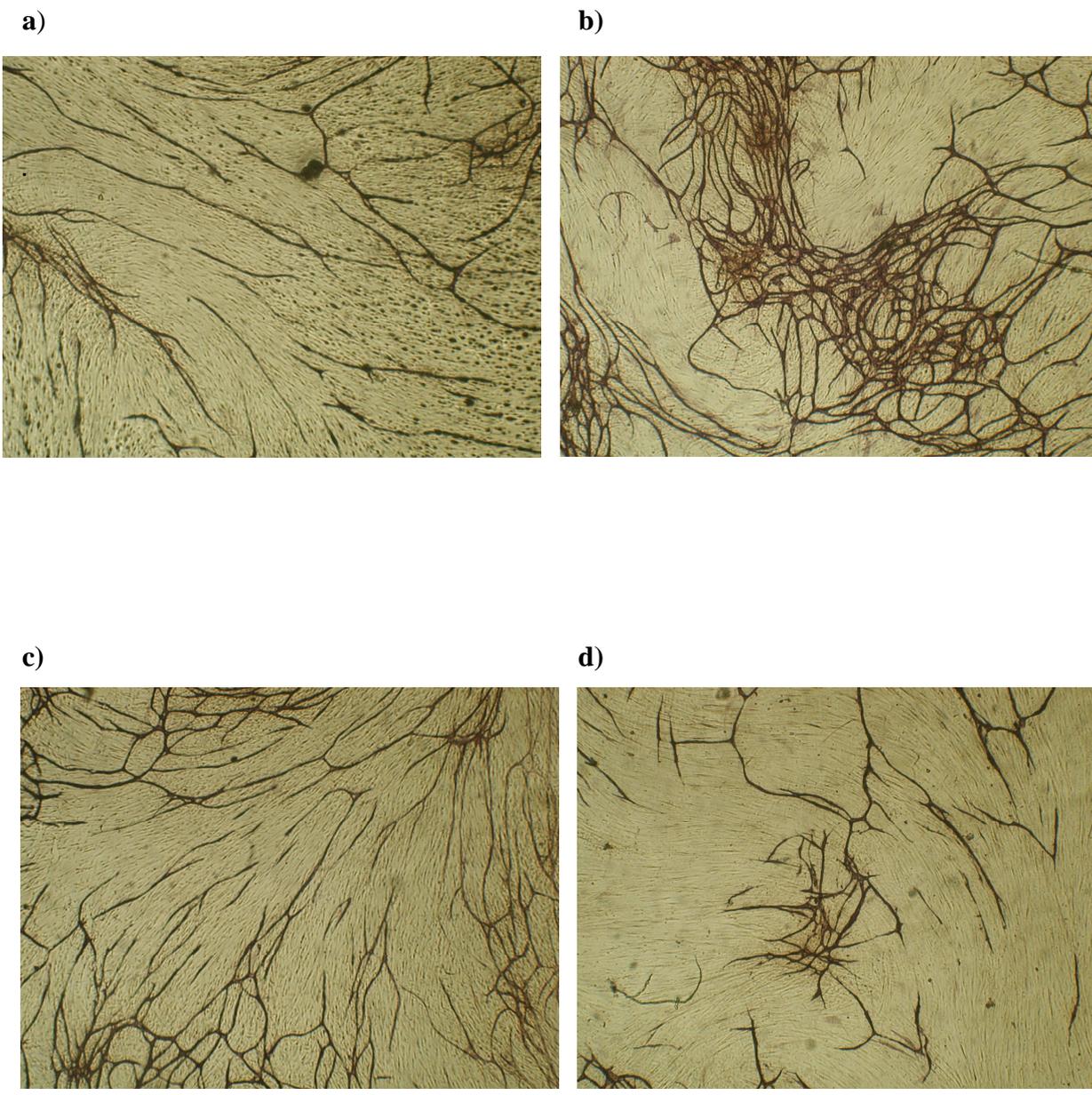


Figura 10. Immagini in microscopia ottica 5x dopo colorazione immunohistochemica. a) controllo negativo, b) VEGF, c) VEGF + Gas6, d) VEGF + suramina

Questi risultati sono stati confermati dal test ELISA con anticorpo anti CD-31 che quantifica la “concentrazione di neovasi”; le assorbanze sono state normalizzate in variazione percentuale rispetto alla media del controllo negativo di ogni esperimento. Viene riportata la media delle variazioni percentuali delle assorbanze per ciascun gruppo sperimentale insieme con la rispettiva deviazione standard (**Tabella 4 e Figura 11**).

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

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

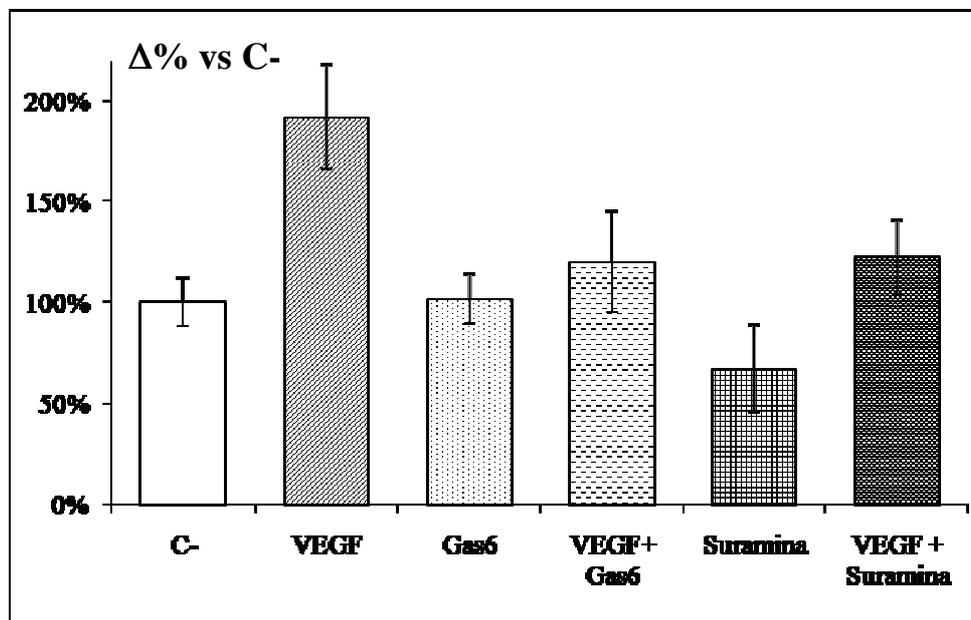


Figura 11. *Variazione percentuale delle assorbanze dei casi VEGF, rhGas6 e VEGF + rhGas6 rispetto al controllo non trattato.*

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

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

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

Mediante un kit ELISA per il dosaggio del VEGF umano abbiamo misurato la concentrazione del VEGF nei surnatanti raccolti dalle linee DU145 e MDA-MB-231 (6 campioni per ciascuna linea cellulare). I surnatanti della linea cellulare DU145 presentavano valori elevati di VEGF con una concentrazione massima di 10 ng/ml. Nettamente inferiore è risultata la produzione di VEGF da parte della linea MDA-MB-231 per cui si è ottenuta una concentrazione massima di VEGF di 3 ng/ml. Dopo esperimenti preliminari, abbiamo quindi impiegato il surnatante di ambedue le linee alla diluizione di 1:4 per la linea DU145 e 1:2 per la linea MDA-MB-231.

Abbiamo quindi eseguito n°3 esperimenti con n°3 casi in replicato per ogni avariabile sperimentale. Non è stato possibile indurre una risposta angiogenica significativa utilizzando il surnatante delle cellule MDA-MB-231 che pertanto non sarà di seguito considerato, mentre è stata ottenuta una buona risposta angiogenica, seppur inferiore al VEGF 2ng/ml, utilizzando il surnatante delle cellule DU 145. Gas6 alla concentrazione di 100 ng/ml è risultato efficace nell'inibire tale effetto (**Tabella 5 e Figura 12**).

Anche in questo caso sono state confrontate le medie della variazione percentuale delle assorbanze del test ELISA con anticorpo primario anti CD31 rispetto al controllo non trattato. In presenza del surnatante delle cellule DU145 abbiamo ottenuto una neovascolarizzazione maggiore rispetto al controllo negativo (post hoc, $p < 0.05$) ma aggiungendo Gas6 100 ng/ml a tale surnatante tale effetto viene inibito (surnatante DU145 vs surnatante DU145+Gas6, post hoc, $p < 0.05$).

<i>Caso</i>	<i>N°casi</i>	<i>Variazione % rispetto a C- ± DS</i>
Controllo non trattato	9	100 ± 12
VEGF	9	181 ± 32
Rh-Gas6	9	102 ± 13
VEGF + rh-Gas6	9	125 ± 29
DU145	9	157 ± 16
DU145 + Gas6	9	106 ± 8

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

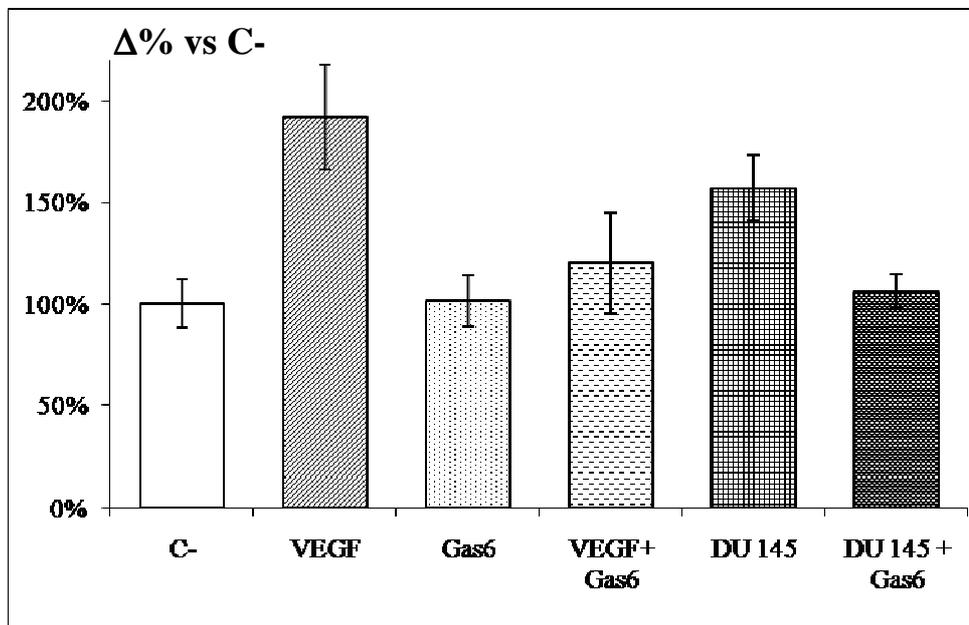


Figura 12. *Variazione percentuale delle assorbanze dei casi VEGF, rhGas6, surnatante DU145 e surnatante DU145+Gas6 rispetto al controllo non trattato.*

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

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

Abbiamo eseguito 1 esperimento preliminare con casi in quintuplicato e 2 esperimenti consecutivi con ciascun caso condotto in quadruplicato. Abbiamo osservato che il surnatante raccolto dalle cellule B16F0 presentavano valori di concentrazione massima di VEGF di ~50 ng/ml. Abbiamo quindi osservato in esperimenti preliminari che il surnatante ad una diluizione 1:5 ha comportato un buon effetto angiogenetico (incremento in media della concentrazione di Hb nei plug di matrigel del 208% rispetto al controllo negativo).

Abbiamo quindi confermato l'efficacia della proteina Gas6 (250 ng/plug) nell'inibire l'angiogenesi neoplastica indotta mediante il surnatante delle cellule B16F0 già riscontrata in un esperimento preliminare. La concentrazione media di Hb è risultata essere di 3.8 ± 1.2 mg/ml per il controllo negativo solo matrigel e 3.6 ± 1.0 per il controllo negativo matrigel + Gas6. In presenza del surnatante della linea B16F0 la concentrazione di Hb è risultata di 7.9 ± 1.7 mentre se al surnatante veniva aggiunto rmGas6 250 ng/plug di 4.6 ± 1.7 (**Figura 13a, 13b**). Pertanto Gas6 ha determinato una riduzione del $44 \pm 21\%$ della concentrazione di emoglobina nei plug di matrigel. Tale riduzione è risultata statisticamente significativa (Test post hoc di Tukey, surnatante B16F0 vs tutti i gruppi $p < 0.002$). Gli altri confronti non sono risultati statisticamente significativi.

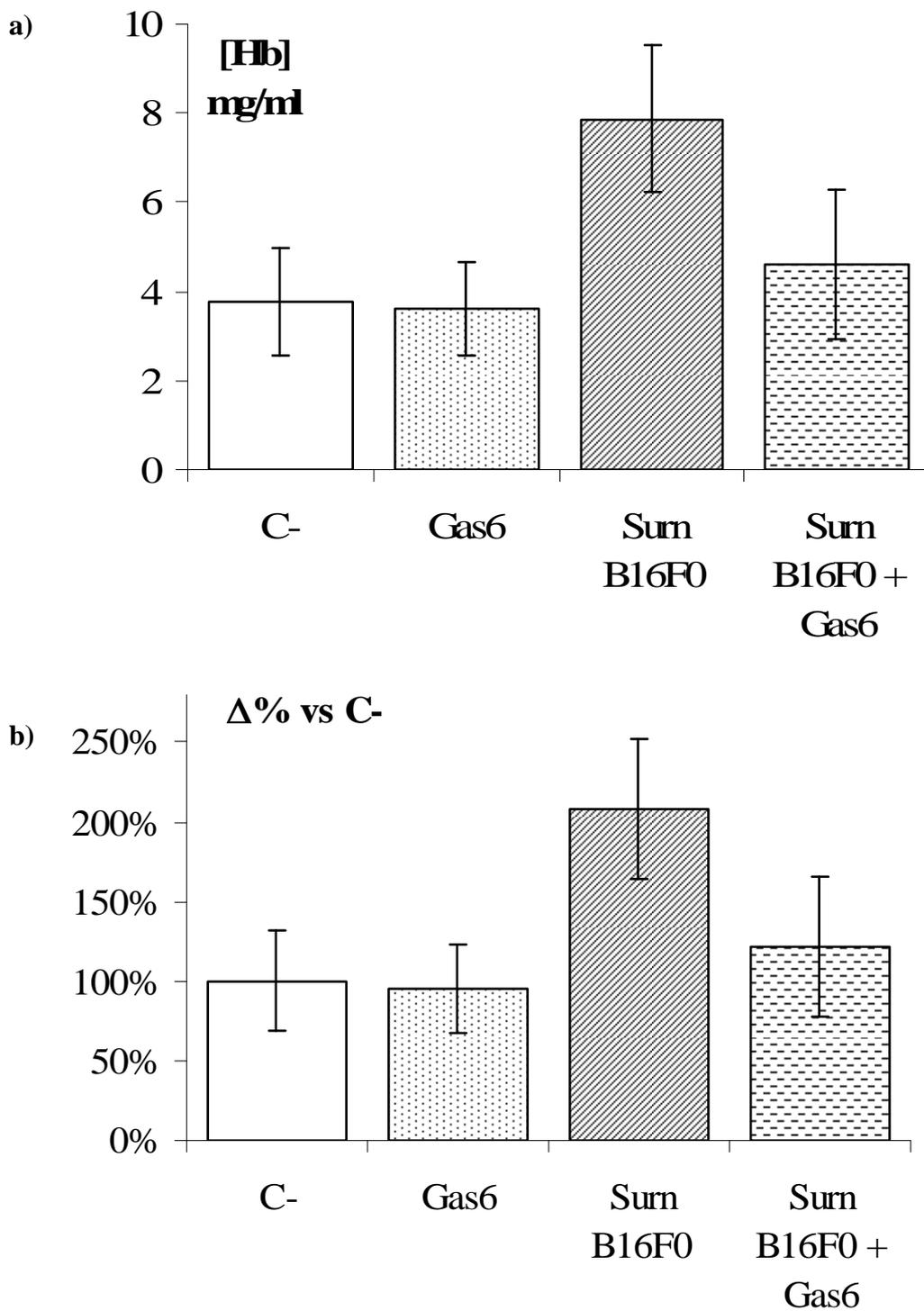


Fig.13 Effetto di Gas6 su angiogenesi tumorale VEGF dipendente. Dosaggio Hb.

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

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

È stato valutato "in vivo" l'effetto di Gas6 sull'angiogenesi tumorale indotta da cellule neoplastiche all'interno del matrigel negli animali da esperimento. Sulla base degli esperimenti condotti negli anni precedenti, abbiamo impiegato linea cellulare tumorale murina non metastatizzante B16F0 (melanoma) singenica con in topi C57BL/6NCr1BR, descritta in letteratura overprodurre VEGF (Ishikawa M et al., 2007).

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

Abbiamo verificato in esperimenti preliminari che 350 cellule diluite in un volume di 500 µl di matrigel mantenute per 2 settimane nel topo producono una crescita tumorale in numerosi macroaggregati all'interno della matrice con una neovascolarizzazione abbastanza costante (valutazione istologica) e che determinano un incremento della neovascolarizzazione di circa 6 volte il controllo non trattato con una concentrazione media di circa 13 mg/ml (misurazione della concentrazione di Hb).

Abbiamo quindi eseguito 3 esperimenti consecutivi con casi in quintuplicato per verificare se la proteina mGas6 aggiunta al plug di matrigel (250 ng/plugin) potesse ridurre l'angiogenesi indotta dalla linea cellulare B16F0. In considerazione della differenza della concentrazione assoluta di Hb ottenuta nei differenti esperimenti condotti abbiamo espresso i risultati in variazione percentuale rispetto alla media del controllo negativo per eseguire così un confronto statistico tra gli esperimenti. L'aggiunta di Gas6 non ha, come prevedibile, determinato alcuna variazione della vascolarizzazione rispetto al controllo negativo. L'inoculo di 350 cellule B16F0/plugin ha determinato un incremento della vascolarizzazione del $657 \pm 98\%$ rispetto al solo matrigel, l'aggiunta di Gas6 ha ridotto tale incremento al $440 \pm 159\%$ (**Figura 14**). Pertanto Gas6 ha determinato una riduzione del $34 \pm 24\%$ della concentrazione di emoglobina nei plug di matrigel in presenza delle cellule B16F0. Tale riduzione è risultata statisticamente significativa (Test post hoc di Tukey, $p < 0.04$).

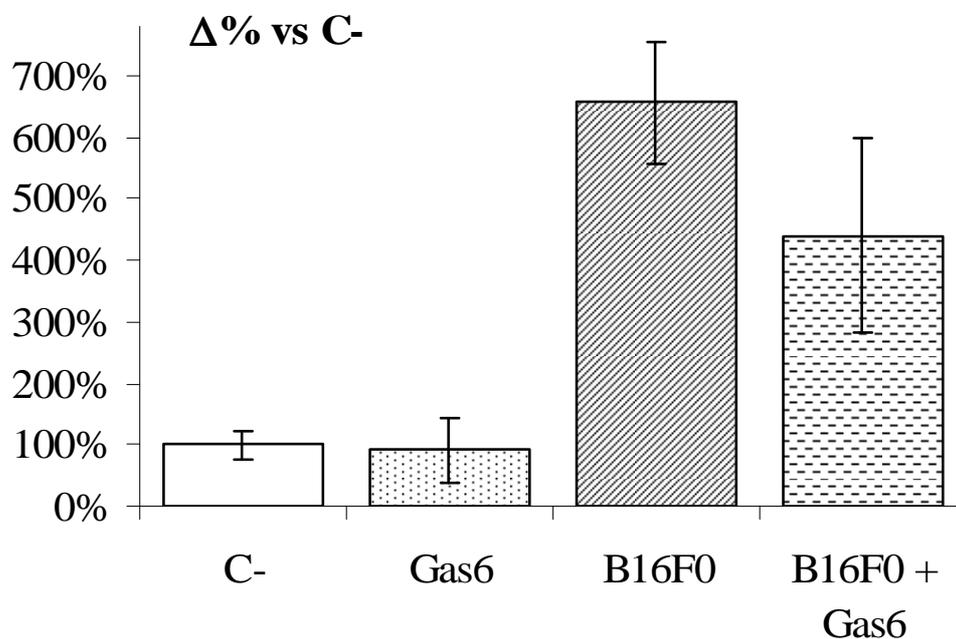


Fig.14 Effetto di Gas6 su angiogenesi tumorale VEGF dipendente indotta da cellule B16F0 inoculate nel matrigel. Dosaggio Hb.

Confronto delle medie delle variazioni percentuali della concentrazione di emoglobina rispetto al controllo negativo nei plugs; le barre di errore mostrano le deviazioni standard de i gruppi.

Clonaggio mGas6 in un vettore di espressione e trasfezione della linea cellulare B16F0.

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

È stata inoltre eseguita la trasfezione liposomiale utilizzando la soluzione DOTAP (Roche, Svizzera) del plasmide ottenuto nella linea cellulare B16F0. È stata anche eseguita la trasfezione del plasmide vuoto (Mock). Sono stati ottenuti numerosi cloni di cellule trasfettate. Mediante Western blot su lisati cellulari totali è stata valutata l’espressione della proteina Gas6 murina da parte delle

cellule trasfettate. 3 dei cloni analizzati presentavano un'espressione misurabile in immunoblot della proteina Gas6, di questi 1 presentava a parità di concentrazione proteica del lisato totale una espressione della proteina Gas6 nettamente maggiore. Tale clone (clone n°6) è stato scelto per i successivi esperimenti (**Figura 15**)

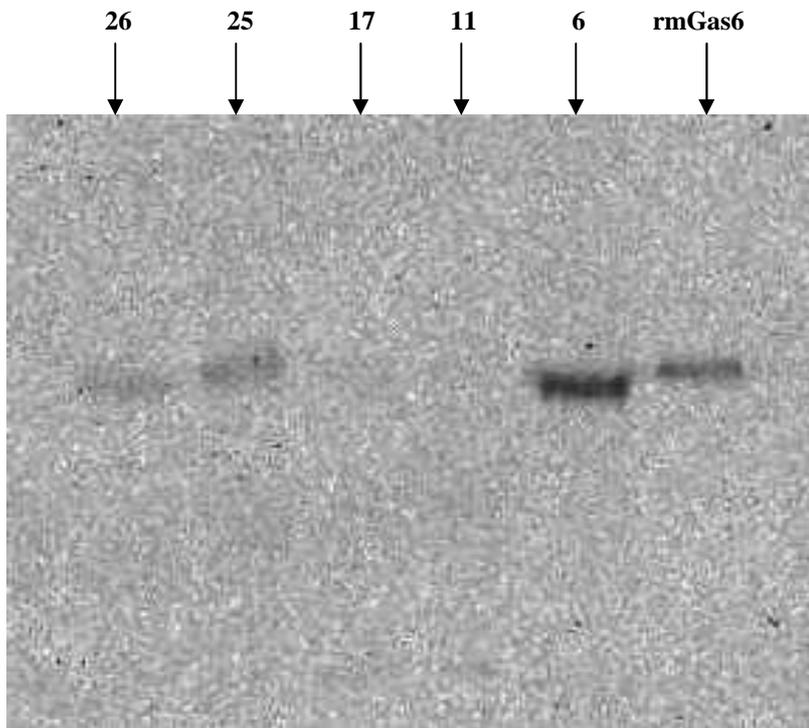


Fig.15Espressione della proteina ricombinante mGas6 da parte dei cloni di cellule B16F0 transfettate

Il Western Blot evidenzia l'espressione della proteina gas6 murina nel lisato cellulare dei cloni 26, 25 e 6. Maggiore espressione si osserva per il clone 6. Nella colonna più a destra si osserva il controllo positivo (rmGas6).

Confronto dell'effetto proangiogenetico indotto dalle cellule B16F0 transfettate con il gene Gas6 rispetto a quelle transfettate con il solo plasmide di espressione (Mock) nel modello del plug di matrigel.

Abbiamo quindi eseguito 3 esperimenti in replicato con casi in quintuplicato per confrontare l'angiogenesi indotta dalla linea cellulare B16F0 iperesprimente mGas6 (Clone 6) rispetto alla linea cellulare transfettata con il plasmide vuoto. Anche in questo caso in considerazione della differenza della concentrazione assoluta di Hb ottenuta nei differenti esperimenti i risultati sono stati espressi in variazione percentuale rispetto alla media del controllo negativo per eseguire così un confronto statistico.

L'inoculo di 350 cellule B16F0(mock)/plug ha determinato un incremento della vascolarizzazione del $533\pm 112\%$ rispetto al controllo negativo (solo matrigel) che è risultato maggiore rispetto a quello ottenuto con le cellule B16F0 transfettate con la proteina Gas6 (B16F0Gas6 clone 6) $324\pm 105\%$. Tale differenza è risultata statisticamente significativa (test post hoc di Tuckey, $p < 0.05$) (**Figura 16**). In pratica l'iperspressione della proteina Gas6 nelle cellule B16F0 ha determinato una riduzione del $39\pm 20\%$ della concentrazione di emoglobina nei plug di matrigel rispetto alle cellule mock.

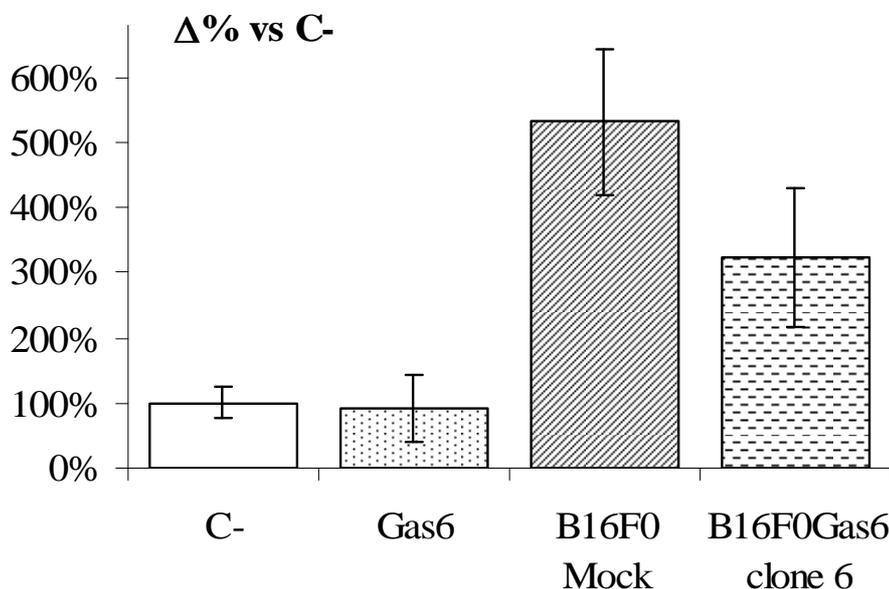


Fig. 16 Confronto dell'effetto proangiogenetico indotto dalle cellule B16F0 transfettate con il gene Gas6 rispetto a quelle transfettate con il solo plasmide di espressione (Mock). Dosaggio Hb.

Confronto delle medie delle variazioni percentuali della concentrazione di emoglobina rispetto al controllo negativo nei plugs e delle rispettive deviazioni standard dei gruppi.

Valutazione dell'effetto della proteina Gas6 rispetto alla crescita tumorale di linee tumorali produttrici di VEGF in modelli murini "in vivo".

È stata valutata la capacità della proteina Gas6 inoculata per via endovenosa di ridurre la crescita locale di neoplasie indotte nell'animale da esperimento mediante inoculo di cellule tumorali sottocute esprimenti VEGF.

Per tale obiettivo abbiamo impiegato sia la linea cellulare B16F0 sia la linea cellulare B16F10 sempre di melanoma murino ma con potenzialità di crescita infiltrativa e metastatizzante. Abbiamo eseguito un esperimento preliminare e una replica sperimentale con ciascuna delle linee cellulari sopra indicate. Tali cellule sono state inoculate in sede sottocutanea in topi singenici C57/bl7. I topi sono stati osservati quotidianamente e sacrificati dopo 15 giorni per escissione delle masse e valutazione autoptica. Per ogni esperimento 10 animali hanno ricevuto l'inoculo delle cellule tumorali, quindi 5 di essi hanno ricevuto 1 µg di rmGas6 e.v. in 100 µl di BSA 1% in soluzione fisiologica nella vena della coda al giorno 3 e 10, i restanti 5 animali hanno ricevuto l'iniezione e.v. del solo solvente alla stessa cadenza temporale.

Abbiamo quindi analizzato il peso delle masse escisse come indice di crescita tumorale. Non abbiamo osservato alcuna differenza statisticamente significativa nel peso delle masse tumorali nei topi trattati rispetto ai topi non trattati per ambedue le linee cellulari. Inoltre la crescita infiltrativa delle masse tumorali e la presenza di estese aree di necrosi soprattutto per quanto riguarda le cellule B16F10 non ha permesso di eseguire un'analisi adeguata della neovascolarizzazione (dosaggio dell'Hb).

Abbiamo invece confrontato la crescita tumorale della linea cellulare B16F0 transfettata con il gene Gas6 rispetto alla stessa linea transfettata con il plasmide vuoto (Mock). In 2 esperimenti con casi in quadruplicato abbiamo osservato un minore peso delle masse tumorali ottenute dall'inoculo delle cellule ricombinanti per Gas6 rispetto ai controlli mock ($0,6 \pm 0,4$ vs $1,4 \pm 0,6$ mg; test t di Student, $p=0.055$). Sono in corso ulteriori esperimenti per confermare tali risultati.

DISCUSSIONE

Gas6 è una proteina multimodulare costituita da un dominio γ -carbossiglutamminico N-terminale, varie sequenze ripetute EGF-like e un doppio dominio globulare carbossi-terminale. Per la sua attività è necessaria la γ -carbossilazione dei residui di acido glutammico dei domini globulari carbossi-terminali mediata dalla vitamina K e presenta analogie (identità al 44%) di sequenza con la proteina S e in minor percentuale con una proteina coinvolta nel trasporto degli ormoni steroidei, la SHBG (Sex Hormones Binding Globulin) (Joseph et al., 1997; Manfioletti et al., 1993).

Gas6 è ligando di 3 recettori tirosina chinasi (RTKs) Tyro3 (denominato anche Rse, Sky, Brt, Tif o Dtk (Godowski et al., 1995), Axl (altresì chiamato Ark, Ufo e Tyro7 (Stitt et al., 1995; Varnum et al., 1995) e Mer (chiamato anche Eyk, Nyk e Tyro12 (Chen et al., 1997).

Gas6 è presente in vari tessuti quali il polmone, epitelio intestinale, midollo osseo, cellule endoteliali VSMCs, nel tessuto ematopoietico (stroma midollare, precursori ematopoietici), nelle piastrine e nei fibroblasti (Avanzi et al., 1997; Manfioletti et al., 1993; Melaragno et al., 1998; O'Donnell et al., 1999).

Un recente lavoro ha dimostrato che la proteina Gas6 ha una funzione inibitoria sul processo angiogenetico indotto dal VEGF in vitro e nel saggio "in vivo" della membrana coriantolloidea di pollo (Gallicchio M et al, 2005). In tale lavoro Gas6 è risultato interferire con la proliferazione, la migrazione e la tubuligenesi delle cellule endoteliali indotta da VEGF-A, con la formazione di neovasi nel modello dell'uovo embrionato di pollo. Tale effetto si esplica attraverso l'attivazione del recettore Axl e la inibizione della fosforilazione del recettore VEGFR-2 verosimilmente tramite l'attivazione della fosfatasi Ship-2 (Gallicchio M et al, 2005)..

Tale lavoro ha fornito le premesse ed il razionale del presente studio condotto allo scopo di valutare se Gas6 potesse essere in grado di interferire sulla neoangiogenesi patologica VEGF mediata indotta da neoplasie.

Nella prima parte del nostro studio abbiamo voluto confermare l'effetto inibitorio di Gas6 sulla angiogenesi VEGF-mediata applicando il modello di studio dell'angiogenesi "in vivo" del matrigel plug. Abbiamo deciso di impiegare tale modello in quanto, a differenza del modello dell'uovo embrionato di pollo, fornisce un microambiente naturale per l'angiogenesi; Matrigel è infatti una matrice extracellulare deprivata di citochine e fattori di crescita prodotta dal sarcoma murino di Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), costituita da laminina, collagene IV, eparan-solfati, proteoglicani in cui le cellule endoteliali rapidamente formano tubuli. Presenta il vantaggio di essere liquido a 4°C ma di solidificare rapidamente a temperature superiori potendo così essere adatto all'inoculo in

animali da esperimento; allo stato liquido può essere infatti mescolato ai reagenti da saggiare nel corso dell'esperimento ed una volta iniettato sottocute, solidifica rapidamente a costituire una massa omogenea, detta "plug" che può essere successivamente asportata dopo il sacrificio dell'animale al termine dell'esperimento, permettendo analisi morfologiche e quantitative dell'angiogenesi. Inoltre tale modello permetta anche di poter inoculare direttamente le cellule tumorali che trovano una matrice in cui crescere simulando l'interazione cellula tumorale endotelio che avviene in vivo. Per tutte queste motivazioni, tale modello ci è parso il più adatto agli obiettivi sperimentali.

Sulla base dei risultati ottenuti nel modello "matrigel plug" sia con valutazione morfologica quantificata con un apposito score istologico sia mediante il dosaggio dell'Hb nei plug di matrigel abbiamo confermato che Gas6 effettivamente inibisce l'angiogenesi tumorale VEGF dipendente "in vivo" alla concentrazione di 250 ng/plug. Tale risultato quindi conferma i dati "in vitro" e quelli ottenuti nel saggio "in vivo" sulla membrana corion-allantoidea di pollo.

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

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

In relazione alla importanza del VEGF-A nella neoangiogenesi tumorale tanto da essere diventato un bersaglio di trattamento e al riscontro confermato con più metodiche sperimentali che Gas6 è un

inibitore della neoangiogenesi VEGF dipendente, abbiamo condotto sia esperimenti “in vitro” sia “in vivo” utilizzando Gas6 come inibitore farmacologico della neoangiogenesi VEGF dipendente.

Per prima cosa abbiamo utilizzato un modello di angiogenesi umana “in vitro” caratterizzato da una cocoltura di cellule endoteliali e fibroblasti che permette di valutare morfologicamente e semiquantitativamente la crescita e l’organizzazione vasale VEGF dipendente. Tale modello, rappresenta un ottimo strumento di valutazione della neoangiogenesi “in vitro” in quanto, a differenza per esempio del modello di matrigel in vitro dove viene valutata soltanto l’attività di fattori di crescita sulla migrazione e morfologia delle cellule endoteliali, si valuta l’angiogenesi in un sistema in cui le cellule endoteliali formano degli abbozzi vascolari in presenza di cellule di supporto, simulando interazioni più complesse e pertanto più vicine alla realtà “in vivo”.

Gas6 alla concentrazione di 100 ng/ml è risultato efficace nell’inibire l’angiogenesi solo quando veniva stimolata mediante l’aggiunta di VEGF-A ma non la crescita e l’organizzazione spontanea delle cellule endoteliali con abbozzo di tubuli disorganizzati che avviene in questo modello in assenza di fattori di crescita per l’interazione delle cellule endoteliali con la matrice extracellulare e con i fibroblasti. Ciò è testimoniato dal fatto che Gas6 determina un’inibizione dell’angiogenesi in presenza di VEGF ma non in sua assenza come invece avviene per la suramina che risulta inibire anche l’angiogenesi non VEGF dipendente. Tale risultato conferma ulteriormente la specificità dell’effetto antiangiogenetico di Gas6 verso l’angiogenesi VEGF dipendente. Inoltre tali risultati ottenuti in un modello complesso di angiogenesi di cocoltura con cellule umane rappresentano una dimostrazione superiore al modello di crescita e organizzazione morfologica delle cellule endoteliale nel matrigel in vitro (Giallicchio et al., 2005). Riteniamo pertanto di concludere che Gas6 rappresenta un inibitore specifico della angiogenesi VEGF dipendente in un modello umano complesso “in vitro” e in un altrettanto complesso modello animale molto prossimo al contesto in cui gli eventi fisiologici dell’angiogenesi si verificano.

Lo stretto legame tra la progressione della malattia neoplastica ed il processo angiogenetico è stato ipotizzato da Folkman più di trenta anni fa. Questo ha portato a considerare la terapia antiangiogenica come elemento importante nel trattamento di molte neoplasie. La terapia antiangiogenetica potrebbe in maniera selettiva le cellule endoteliali in proliferazione tumultuosa come nel caso dell’angiogenesi patologica senza interferire con i normali e fisiologici processi angiogenetici (Zhi H e Shi-Deng B, 2004). Inoltre l’inibizione dell’angiogenesi tumorale mediante l’inibizione dell’attività di VEGF rappresenta un approccio terapeutico razionale. VEGF, infatti, è il fattore chiave nell’induzione dell’angiogenesi ed è iperespresso in un gran numero di tumori umani (Liekens S et al, 2001).

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

In relazione alla importanza del VEGF-A nella neoangiogenesi tumorale tanto da essere diventato un bersaglio di trattamento e al riscontro confermato con più metodiche sperimentali che Gas6 è un inibitore della neoangiogenesi VEGF dipendente, abbiamo condotto sia esperimenti "in vitro" sia "in vivo" allo scopo di valutare l'eventuale efficacia di Gas6 nell'inibire la neoangiogenesi tumorale.

Quindi abbiamo valutato l'effetto di Gas6 nel ridurre l'angiogenesi indotta da neoplasie solide note produrre VEGF. Anche in questo caso abbiamo ottenuto risultati sia nel modello "in vitro" umano, sia "in vivo" nel topo. Infatti nel modello "in vitro" Gas6 è risultato inibire la neoangiogenesi indotta dal surnatante della linea cellulare metastatizzante di prostata DU145 così come "in vivo" quella indotta dal surnatante della linea B16F0 sia dalle cellule B16F0 inoculate nel matrigel plug. Inoltre la linea B16F0 ricombinante per overesprimere Gas6 è risultata avere capacità di indurre neoangiogenesi inferiore rispetto alla linea non transfettata.

A differenza degli esperimenti "in vitro" ed "in vivo" in cui era stato inoculato VEGFA, quando è stato inoculato il surnatante delle cellule endoteliali o le cellule endoteliali stesse, abbiamo osservato una riduzione della neoangiogenesi, ma non una sua completa abolizione. Questo fatto non è da interpretarsi come una contraddizione dei precedenti risultati ma come una conferma degli stessi, infatti abbiamo impiegato linee cellulari tumorali note overesprimere il VEGF ma che sicuramente producono altri fattori proangiogenetici; pertanto è verosimile che l'effetto parziale sia dovuto esclusivamente all'inibizione della porzione della neoangiogenesi stimolata direttamente dal VEGFA ma non di quella determinata da altri fattori. Tale fatto spiega inoltre l'apparente paradosso per cui abbiamo ottenuto una risposta angiogenetica maggiore utilizzando i surnatanti delle cellule tumorali in cui in realtà la concentrazione di VEGF era di molto inferiore a quella impiegata per indurre l'angiogenesi nei plug di matrigel(100 ng/ml). Anche tale fatto è spiegabile con la presenza nel surnatante delle linee tumorali di numerosi fattori proangiogenetici che verosimilmente hanno attività sinergica per cui più sostanze a minore concentrazione inducono una maggiore risposta vascolare.

Tali risultati sono la prima dimostrazione dell'effetto di Gas6 nel controllo dell'angiogenesi patologica VEGF dipendente. A tale riguardo si possono formulare alcune considerazioni. Gas6 è una proteina fisiologica circolante nel plasma umano ad una concentrazione di circa 20 ng/ml (Alciato F et al., 2008) ma la fonte di tale produzione non è del tutto nota, infatti cellule del sistema immunitario (monociti) (Lemke e Lu, 2003) così come le cellule endoteliale ne esprimono RNA messaggero e trascritto proteico (Avanzi G et al., 1998). Si potrebbe ipotizzare quindi che gas6 possa essere un inibitore fisiologico della neoangiogenesi con la funzione di favorire la stabilizzazione dell'endotelio dei vasi maturi sfavorendo la crescita di nuovi vasi. Tuttavia Gallicchio et al (2005) hanno evidenziato un effetto antiangiogenetico in vitro a concentrazioni comprese tra 40 e 100 ng/ml. Inoltre nel nostro studio abbiamo evidenziato un effetto significativo sull'inibizione dell'angiogenesi in vitro a partire alla concentrazione di 100 ng/ml con perdita di efficacia a 40 ng/ml. Infine abbiamo evidenziato, in vivo, un effetto antiangiogenetico riguardo alla angiogenesi tumorale con dosi di Gas6 di 250 ng/plug, con quindi concentrazioni locali piuttosto elevate. Di conseguenza è plausibile che la concentrazione plasmatica della proteina Gas6 (~20 ng/ml) (Alciato F et al., 2008) sia verosimilmente poco efficace nel garantire un effetto antiangiogenetico e comunque sicuramente inefficace a contrastare un processo patologico con overespressione locale di VEGF-A. Pertanto in condizioni patologiche l'eccesso di produzione di fattori proangiogenetici superano tale effetto inibitorio, così come in letteratura è stato dimostrato per altri inibitori fisiologici dell'angiogenesi (Risau W, 1997).

Uno spunto interessante ci viene a tale proposito ricordando che Gas6 può essere prodotto fisiologicamente dai periciti e dalle VSMCs (Collet G et al, 2003), che sono di importanza critica per la morfogenesi vascolare nell'embrione e nella vita adulta favorendo la stabilizzazione degli abbozzi vascolari, di fatto permettendo la maturazione vasale (Adams RH e Alitalo K, 2007). Questo fatto può permetterci alcune speculazioni, naturalmente da confermarsi con dati sperimentali, riguardo al possibile ruolo della proteina Gas6 come "fisiologico" stabilizzatore dei vasi maturi. Infatti l'espressione di Gas6 da parte delle cellule di rivestimento della parete vascolare potrebbe permettere il raggiungimento di concentrazioni locali della proteina molto elevate e quindi efficaci a inibire il segnale del VEGFA in condizioni fisiologiche. In condizioni patologiche invece la produzione fisiologica di Gas6 verrebbe soverchiata dall'effetto del VEGFA in eccesso, tanto che per riprodurre l'equilibrio abbiamo dovuto utilizzare concentrazioni di Gas6 5-10 volte quelle fisiologiche plasmatiche.

Una breve considerazione va fatta anche sull'apparente paradosso della proteina Gas6 che inibirebbe l'effetto del VEGFA ma contemporaneamente ha una dimostrata azione antiapoptotica sulle cellule endoteliali (Avanzi GC et al, 1998). L'apparente paradosso di un fattore antiapoptotico che contribuisce nell'inibire l'angiogenesi è sostenuto dalle recenti conclusioni sulla fortilina.

Questo è un fattore nucleare antiapoptotico, che inibisce la migrazione delle cellule muscolari lisce *in vitro*. In un modello sperimentale di angioplastica, la fortilina riduce la formazione di neointima attraverso azioni fortemente antiproliferative e antimigratorie concomitanti con l'abilità a ridurre l'apoptosi delle cellule vascolari e a mantenere l'integrità della parete vasale (Tulis DA et al, 2003). Altra ipotesi può essere semplicemente quella che anche in una situazione di quiescenza vasale è necessario un fattore antiapoptotico che permetta la sopravvivenza dell'endotelio a situazioni di stress.

Un altro aspetto meritevole di discussione è il fatto che non abbiamo osservato un effetto significativo della somministrazione endovenosa della proteina Gas6 sulla crescita delle masse tumorali in vivo negli animali da esperimento. Tuttavia tale effetto si è osservato, seppur parziale, nelle cellule ricombinate per Gas6. Possiamo quindi pensare che il problema sia "farmacocinetico" ovvero che le dosi somministrate di Gas6 non siano risultate sufficienti per ottenere una concentrazione locale efficace di Gas6, ottenuta invece con le cellule ricombinanti. Gli esperimenti di farmacocinetica condotti hanno confermato tale ipotesi infatti l'emivita della proteina Gas6 è risultata essere molto breve tanto che i valori plasmatici dopo somministrazione tornavano completamente alla normalità dopo 12 ore. Pertanto solo somministrazioni ripetute di tale sostanza potrebbero essere efficaci. Stiamo lavorando per identificare le motivazioni di una così breve emivita.

Possiamo ipotizzare una possibile applicazione della proteina Gas6 somministrata a dosi "farmacologiche" per sopperire alla overproduzione di VEGF in condizioni patologiche come per esempio nel caso di neoplasie solide esprimenti VEGF o nel caso di neoangiogenesi in altri processi patologici come per esempio la retinopatia diabetica o tutti i processi infiammatori cronici con la formazione di tessuto infiammatorio (ad. es il panno infiammatorio dell'artrite reumatoide). Gas6 quindi potrebbe essere un potenziale strumento terapeutico per controllare l'angiogenesi patologica VEGF dipendente.

L'interferenza con i segnali mediati dal VEGF-A sembra essere la strada più promettente per future applicazioni terapeutiche. Inoltre, delineare un meccanismo selettivo che reverte l'effetto del VEGFR-2 può facilitare lo studio di efficaci terapie combinate per la distruzione della rete vascolare nei tumori.

Anche se le conoscenze sono limitate, sul ruolo giocato da Gas 6 nelle malattie, il nostro studio fornisce ulteriori evidenze sperimentali sulla potenziale efficacia terapeutica di gas6 nell'inibizione della neoangiogenesi patologica. Opportuni studi di farmacocinetica sono tuttavia necessari per identificare la dose e la frequenza di somministrazione più adatta per ottenere adeguate concentrazioni terapeutiche della proteina.

PARTE II

Ruolo della proteina Gas6 nelle malattie infiammatorie demielinizzanti del sistema nervoso.

MALATTIE INFIAMMATORIE DEMIELINIZZANTI DEL SISTEMA NERVOSO CENTRALE: 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 sclerosi delle aree colpite 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. 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 danni neurologici irreversibili (Victor M e Ropper AH, 2005). La SM è tra i disturbi neurologici più diffusi tra i giovani adulti ed è la principale causa neurologica di disabilità. Esordisce tra i 20 e i 40 anni con un picco intorno ai 30 anni ed è invece poco frequente al di sotto dei 15 e sopra i 50 anni. Colpisce le donne con una frequenza di 3:2 rispetto agli uomini. I sintomi della SM dipendono dalla localizzazione dei focolai infiammatori e possono compromettere la vista, la coordinazione motoria, l'equilibrio, la capacità cognitiva, la memoria, l'articolazione delle parole, la sensibilità fino ad arrivare alla paralisi. (Hafler DA, 2004; Sotgiu S et al, 2004).

La SM presenta caratteristiche assai variabili di evoluzione. Nel 10% dei casi la malattia ha un andamento progressivo fin dall'inizio (forma primaria progressiva, SM-PP); nel restante 90% la malattia inizia con un episodio di durata transitoria caratterizzato da un deficit neurologico di uno o più sistemi funzionali, seguito da parziale o completo recupero, per poi ricomparire dopo un intervallo di tempo variabile, secondo le stesse modalità o con la comparsa di nuove anomalie riferibili all'interessamento di altre parti del sistema nervoso (forma recidivante-remittente). Il primo episodio di deficit neurologico riferibile ad evento demielinizzante viene definito "clinically isolated syndrome" (CIS). Dopo il primo episodio di malattia, a distanza di tempo variabile, possono verificarsi fasi di riattivazione, con la caratteristica che, con il tempo, gli esiti tendono ad accumularsi e a farsi più stabili (Victor M e Ropper AH, 2005).

A fronte dell'estrema variabilità con cui la malattia evolve, si è sempre posta la necessità di definire l'evoluzione secondo alcuni profili codificati. Circa l'85-90% dei pazienti all'esordio presentano un

andamento clinico con poussées e remissioni (RRMS – Relapsing Remitting Multiple Sclerosis). Di questi una parte, sempre più rilevante con il progredire dell'età (40% entro 10 anni e 65% entro 25), sviluppa una progressione lenta ma continua della disabilità in assenza di remissioni (SPMS – Secondary Progressive Multiple Sclerosis). Una minoranza di pazienti, 10-15%, dall'esordio della malattia non presenta poussées e remissioni ma una progressione delle disabilità continua nel tempo (PPMI – Primary Progressive Multiple Sclerosis). Si ha quindi una malattia con andamento progressivo sin dall'esordio con occasionali plateaux e temporanei rallentamenti della progressione caratterizzata dall'elemento essenziale di un graduale, quasi continuo peggioramento con piccole variazioni ma in assenza di poussées definite. Tutte le forme di progressione che sono state precedute da periodi di poussées e remissioni vengono considerate SPMS. Viene invece mantenuta come categoria distinta la forma "PRMS progressive-relapsing" caratterizzata da poussées e remissioni all'interno di un trend progressivo dall'esordio (Lublin FD e Reingold SC, 1996).

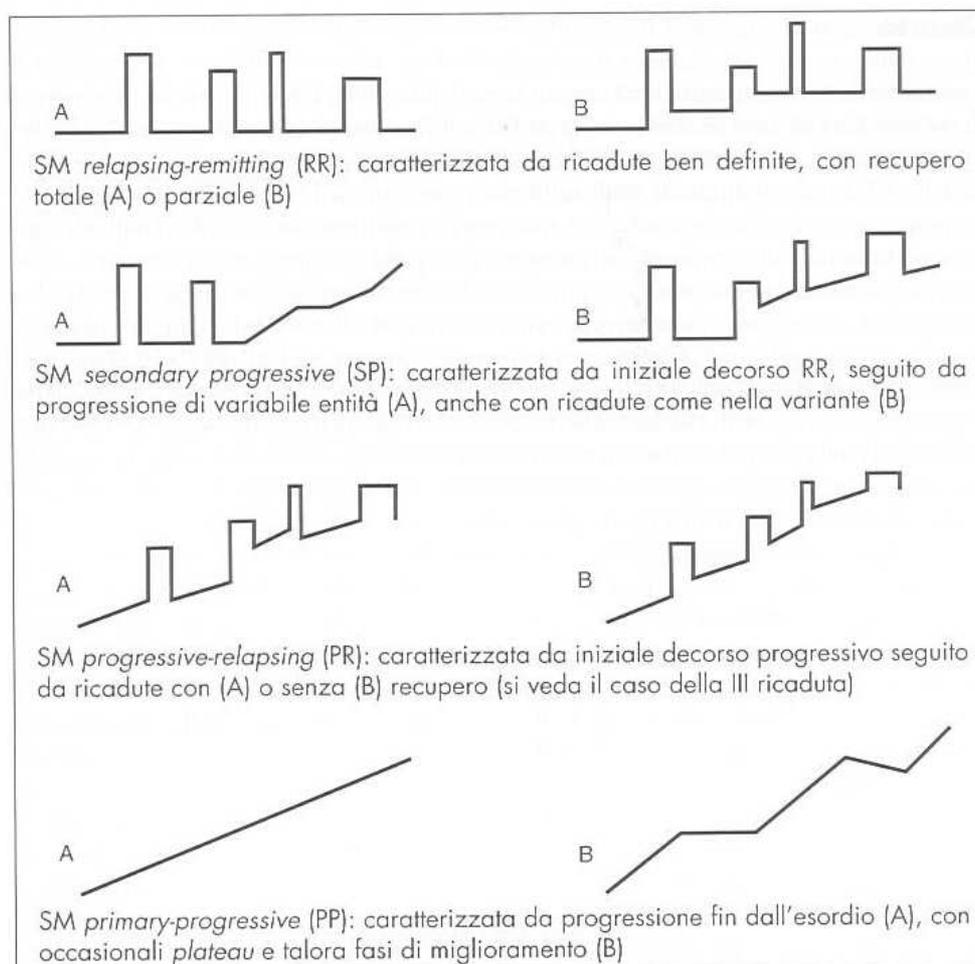


Fig. 17. Decorsi della SM secondo Lublin e Reingold.

Le ricadute sono la caratteristica clinica peculiare della malattia; esse sono infatti caratterizzate dalla comparsa improvvisa di uno o più sintomi neurologici o dalla recidiva di uno o più di essi con una fase di peggioramento, quindi di stabilità, seguita da un progressivo miglioramento che potrà essere anche completo. Per molti anni durante la sua storia naturale, le recidive rappresentano un elemento altamente caratterizzante il decorso; in gran parte dei trial clinici, la riduzione della loro frequenza rappresenta l'end point primario (Liu C e Blumhart LD, 1999).

Le ricadute si differenziano per durata, severità e probabilità di lasciare sequelae. Mentre la durata minima dei sintomi è stata definita, non così è per la durata massima. Più della metà delle ricadute presenta un aumento di almeno un punto della scala EDSS durante il suo decorso (Buljevac et al., 2002). Circa il 30% delle ricadute può lasciare una sequela, definita come "incompleto recupero del deficit neurologico dopo l'attacco" (Liu C e Blumhart LD, 1999).

La definizione di ricaduta più comunemente impiegata è quella di Schumacher che, nel 1965, definiva la ricaduta come "un periodo di peggioramento nei sintomi neurologici della durata di almeno 24 ore, dopo un periodo di un mese di stato clinico di benessere o di miglioramento clinico".

Non devono essere considerate recidive di malattia sintomi e segni neurologici in corso di stati febbrili, di infezioni di varia natura, esacerbazioni di malattia dovuta al caldo, la fatica, peggioramenti dopo iniezione di interferone (generalmente i pazienti lamentano spasticità).

La maggior parte dei pazienti presenta recidive significative tali da necessitare una pronta terapia corticosteroidea. L'immediata somministrazione infatti accelera il recupero delle recidive. (Victor M e Ropper AH, 2005).

Patogenesi

Negli ultimi anni l'attenzione si è focalizzata sul ruolo patogenetico di specifici sottotipi di linfociti T che regolano la risposta immunitaria umorale con effetto sia positivo (cellule T helper) sia negativo (cellule T suppressor) sulla produzione di immunoglobuline da parte dei linfociti B. I linfociti T helper (CD41) si trovano in abbondanza all'interno delle placche di demielinizzazione e delle venule circostanti. I recettori delle cellule T rispondono ad antigeni presentati dalle molecole di classe II del complesso maggiore di istocompatibilità (MCH) dei macrofagi e degli astrociti. Questa interazione determina la stimolazione delle cellule T, l'attivazione dei linfociti B, macrofagi e la secrezione di citochine. Questi eventi determinano un danno della barriera emato encefalica con successiva distruzione mielinica. La suscettibilità genetica rende tuttavia alcuni individui più soggetti a questi eventi immunologici. Il processo di demielinizzazione impedisce la conduzione elettrica saltatoria (Hafler DA, 2004).

L'attacco acuto della SM inizia con l'attivazione delle cellule T in periferia da parte di antigeni (Figura 18). Queste cellule T una volta attivate, sono in grado di oltrepassare la BEE, interagire con le cellule presentanti l'antigene site nell'ambito del SNC, produrre una serie di citochine pro-infiammatorie e infine di attivare 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-1. Il processo infiammatorio vero e proprio, comincia quando inizia la sintesi dell'IL-12 che favorisce la produzione di IFN- γ e TNF- α . 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. Quando avviene in modo acuto e reversibile nel giro di pochi giorni il blocco di conduzione nervosa è funzionale piuttosto che anatomico. Il recupero pertanto, in così breve tempo è dovuto non tanto ai processi di remielinizzazione che avvengono più lentamente ed in modo parziale, quanto a regressione dell'edema e delle alterazioni infiammatorie acute all'interno e attorno alla lesione (Hafler DA et al., 2005).

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 remielinizzazione si manifesta in shadow plaques. Queste aree sono adiacenti alle aree di demielinizzazione attiva e della distruzione. 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 remielinizzazione (Hafler DA, 2004; Hafler DA et al., 2005).

Una caratteristica peculiare della SM sta nel fatto che fattori quali il fumo, l'affaticamento, l'iperventilazione e l'aumento della temperatura ambientale peggiorano le funzioni neurologiche per breve tempo; tale condizione pertanto può essere facilmente confusa con una esacerbazione di malattia. Altri eventi scatenanti le esacerbazioni di malattia sono stati individuati quali le infezioni respiratorie o gastrointestinali, i traumi e la gravidanza.

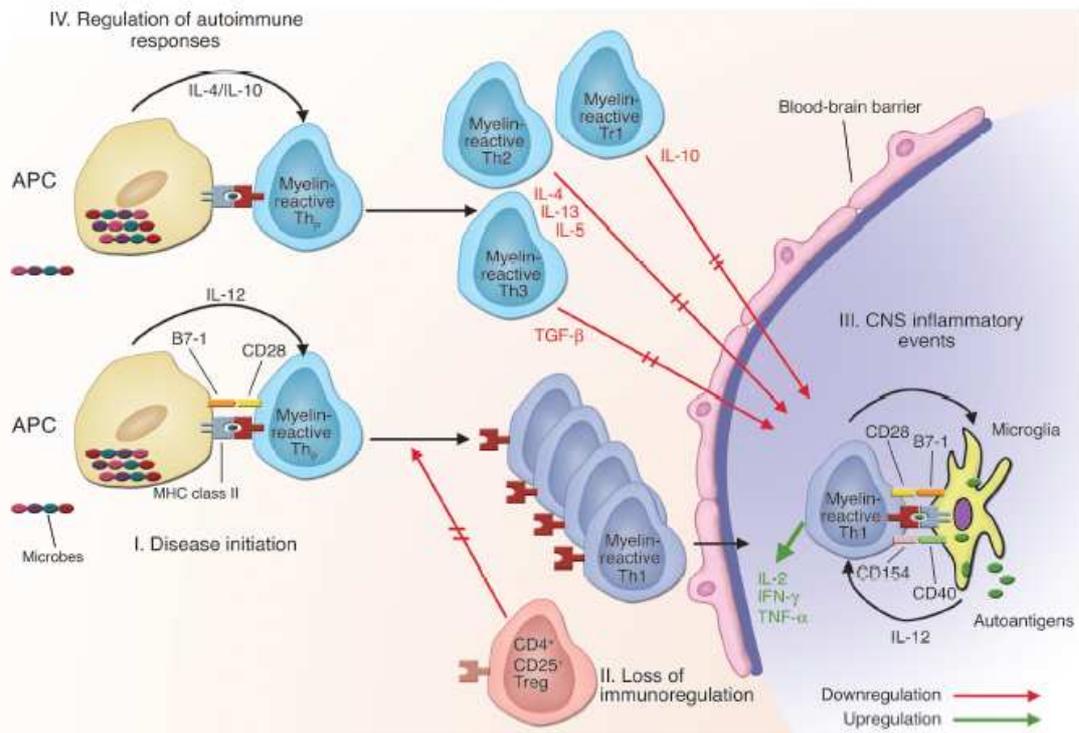


Figura 18. (Hafler DA, 2004). Le cellule T reattive alla mielina nel sangue periferico sono attivate attraverso il legame del loro TCR al peptide della mielina presentato dal MHC sul APC, e sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica. Nel SNC, le cellule sono riattivate dai loro antigeni bersaglio. Le citochine tossiche come il TNF- α e IFN- γ , secrete dalle cellule T e APC, accanto agli anticorpi e le proteine del complemento, mediano il danno tissutale associato alla malattia.

MALATTIE INFIAMMATORIE DEMIELINIZZANTI DEL SISTEMA NERVOSO PERIFERICO, SINDROME DI GUILLAIN BARRÉ (GBS) E CIDP (CHRONIC INFLAMMATORY DEMYELINATING POLYNEUROPATHY)

Sindrome di Guillain Barré (GBS)

Nel 1859, un medico francese, Laundry, descrisse una patologia dei nervi periferici che comportava paralisi degli arti inferiori, arti superiori, del collo e dei muscoli respiratori del torace. Georges Guillain, Jean Alexander Barré, e André Strohl, nel 1916 dimostrarono l'aumento proteico nel liquido spinale con una conta cellulare normale in questa condizione. La sindrome di Guillain-Barré è una poliradiculoneurite infiammatoria acuta demielinizzante. (Hughes RC e Cornblath D, 2005).

L'eziologia è ignota, l'ipotesi più probabile è quella di un virus che provochi indirettamente la sindrome, innescando una risposta autoimmunitaria postinfettiva contro il nervo. Colpisce in genere individui fra i 30 e 50 anni e l'incidenza annuale è di 0,6–4 casi/100 000 (Ropper AH, 1992). 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 BC et al., 1998). Questa sindrome inizia a livello degli arti inferiori con rapida risalita dei sintomi fino a raggiungere - entro 8-10 giorni - 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 (il coinvolgimento muscolare è tipicamente simmetrico e omogeneo, essendo coinvolti i muscoli prossimali come i distali. Sono colpiti anche i muscoli del collo, della nuca e il diaframma). I sintomi sensitivi sono: frequenti e 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 (Hughes RC e Cornblath D, 2005).

La diagnosi viene fatta sulla base dei seguenti accertamenti diagnostici: *elettromiografia*: mostra un precoce e importante rallentamento della velocità di conduzione (riduzione del 50%); *esame dei riflessi*: ariflessia; *puntura lombare*: l'esame del liquor mostra una dissociazione albumino-citologica (aumento delle proteine con normalità del numero delle cellule presenti)

I criteri clinici sui quali si basa la diagnosi di GBS sono i criteri seguenti secondo Asbury e Cornblath (1990):

I. Caratteristiche richieste per la diagnosi

- A. Debolezza motoria progressiva di più di un arto.
- B. Areflessia.

II. Caratteristiche fortemente di supporto per la diagnosi:

- 1. Progressione. I segni ed i sintomi motori della debolezza progrediscono velocemente, ma smettono di progredire intorno alla quarta settimana della malattia. Approssimativamente il 50% raggiunge il nadir in due settimane, l'80% in tre settimane e più del 90% in quattro settimane.
- 2. Simmetria relativa.
- 3. Lievi segni o sintomi sensitivi.
- 4. Coinvolgimento dei nervi facciali.
- 5. Guarigione. Essa normalmente avviene dopo due-quattro settimane dall'arresto della progressione.
- 6. Disfunzioni autonome.
- 7. Assenza di febbre al momento dell'insorgenza dei sintomi neurologici.

III Caratteristiche che rendono dubbia la diagnosi:

- 1. Asimmetria marcata e persistente di debolezza.
- 2. Persistenti disfunzioni delle vescica o dell'intestino.
- 3. Insorgenza di disfunzione intestinale o vescicale.
- 4. Presenza nel LCS di più di 50 monociti per mm^3 .
- 5. Presenza nel LCS di polimorfonucleati.
- 6. Livello sensitivo netto.

IV. Caratteristiche che escludono la diagnosi:

- 1. Storia di abuso di esocarboni.
- 2. Diagnosi di porfiria acuta intermittente.
- 3. Storia o dati di recente infezione difterica con o senza miocardite.
- 4. Caratteristiche cliniche conformi a neurite tossica.
- 5. Sindrome puramente motoria.
- 6. Diagnosi di poliomielite, botulismo, paralisi isterica che occasionalmente possono essere confuse con la sindrome di Guillain-Barrè.

Sebbene gran parte dei pazienti presenti la tipica forma clinica di polineuropatia acuta infiammatoria demielinizzante (AIDP), negli ultimi anni numerose varianti di tale sindrome sono state descritte con selettiva compromissione distrettuale, quali la sindrome di Miller Fisher caratterizzata dalla triade oftalmoplegia, atassia e areflessia, le varianti oculofaringea, facciale, paraparetica, o funzionale, quali le forme puramente motorie, sensitive e autonome. Analogamente, dal punto di vista anatomopatologico, accanto alla classica forma demielinizzante, sono state descritte forme primitivamente assonali motorie dette neuropatia acuta assonale motoria (AMAN) o sensitivomotorie (AMSAN) (Mc Khan GM et al., 1993; Griffin JW et al., 1996), ampliando, di fatto, i confini di questa sindrome.

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 (cellulare e/o anticorpale, vedi in seguito) 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 (Hughes RC e Cornblath D, 2005). 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 linfociti 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- α , interleuchina 2 (IL-2) e il suo recettore solubile (sIL-2R), e IL-1 che si riducono durante il recupero, parallelamente all'incremento della citochina antinfiammatoria TGF- β 1; dal fatto che il modello animale di GBS, cioè la neurite allergica sperimentale (EAN), può essere trasferita passivamente ad animali sani mediante linfociti CD4+ sensibilizzati alla P2 provenienti da animali affetti e dalla capacità di tali linfociti di distruggere *in vivo* la mielina dei nervi periferici. 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, entrambe ritenute efficaci nelle patologie anticorpo mediate e dalla frequente associazione di tale malattia con anticorpi di tipo IgG contro vari antigeni del nervo ed in particolare i gangliosidi GM1, il GD1a, GT1a, GM2, GQ1b e altri gangliosidi minori (Hughes RC e Cornblath D, 2005). La presenza di tali anticorpi è stata correlata sia con forme particolari di GBS, quali la AMAN o AMSAN per gli anticorpi anti- GM1 e anti-GD1a, la AIDP per quelli anti-GM2 e la sindrome di Miller Fisher per quelli anti-GQ1b, sia con determinati antecedenti infettivi, tra cui in particolare il *C. jejuni* per gli anti-GM1, -GQ1b e -GD1a

e il Citomegalovirus per quanto riguarda gli anti-GM2. Tali associazioni, sebbene spesso statisticamente significative, non sono sempre presenti, così che il ruolo non solo diagnostico e prognostico ma anche quello patogenetico di questi anticorpi rimane da chiarire, nonostante vi siano ormai numerosi studi che dimostrano la capacità di tali anticorpi di alterare *in vitro* la trasmissione nervosa, nonché la possibilità di indurre in animali forme di GBS mediante immunizzazione con ganglioside (Yuki N et al., 2001).

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 (differenza fondamentale dalla sindrome di Guillain-Barré, che è auto-limitata). 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 H et al., 2005).

Il decorso può essere a *poussée* o cronico e progressivo, questo ultimo è più comune nei adulti giovani. In tutte queste definizioni, la diagnosi è basata principalmente sulle caratteristiche cliniche e sullo studio elettrofisiologico; l'esecuzione della valutazione del liquido cerebrospinale e la biopsia del nervo possono essere necessari per confermare la diagnosi. Infatti se il liquido cerebrospinale e la biopsia del nervo sono obbligatori per confermare la diagnosi definitiva della malattia secondo i criteri dell' American Academy of Neurology (AAN, 1991), ciò non accade per i criteri proposti da Saperstein et al., 2001 e dal gruppo INCAT (Hughes R et al., 2001).

Feature	AAN Criteria	Saperstein Criteria	INCAT Criteria
Clinical involvement	Motor dysfunction, sensory dysfunction of >1 limb, or both	Major: symmetric proximal and distal weakness; minor: exclusively distal weakness or sensory loss	Progressive or relapsing motor and sensory dysfunction of more than 1 limb
Time course (mo)	≥2	≥2	>2
Reflexes	Reduced or absent	Reduced or absent	Reduced or absent
Electrodiagnostic test results	Any 3 of the following 4 criteria: partial conduction block of ≥1 motor nerve, reduced conduction velocity of ≥2 motor nerves, prolonged distal latency of ≥2 motor nerves, or prolonged F-wave latencies of ≥2 motor nerves or the absence of F waves†	2 of the 4 AAN electrodiagnostic criteria	Partial conduction block of ≥2 motor nerves and abnormal conduction velocity or distal latency or F-wave latency in 1 other nerve; or, in the absence of partial conduction block, abnormal conduction velocity, distal latency, or F-wave latency in 3 motor nerves; or electrodiagnostic abnormalities indicating demyelination in 2 nerves and histologic evidence of demyelination
Cerebrospinal fluid	White-cell count <10/mm ³ , negative VDRL test; elevated protein level (supportive)	Protein >45 mg/dl; white-cell count <10/mm ³ (supportive)	Cerebrospinal fluid analysis recommended but not mandatory
Biopsy findings	Evidence of demyelination and remyelination	Predominant features of demyelination; inflammation (not required)	Not mandatory (except in cases with electrodiagnostic abnormalities in only 2 motor nerves)

Tabella 6. (da Köller H et al., 2005). Criteri diagnostici proposti American academy of Neurology (AAN, 1991), Saperstein et al, 2001 e Hughes et al 2001 per il gruppo INCAT (Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment).

Sono descritte forme di polineuropatie demielinizanti differiscono dalla polineuropatia demielinizante infiammatoria cronica classica per quanto riguarda alla presentazione clinica e la risposta al trattamento. Non è chiaro se queste condizioni siano varianti della polineuropatia demielinizante infiammatoria cronica oppure malattie distinte (Köller H et al., 2005).

Distal Acquired Demyelinating Symmetric Neuropathy: la neuropatia distale acquisita simmetrica demielinizante presenta un'augmentata prevalenza negli uomini e nei soggetti con più di 50 anni. Si caratterizza per un danno sensitivo prevalentemente distale, una lieve ipostenia distale (rispetto ai più generalizzati deficit motori nella polineuropatia demielinizante infiammatoria cronica classica) con instabilità della marcia. Si osserva una paraproteinemia IgM in quasi due terzi dei pazienti con questa malattia. La neuropatia simmetrica demielinizante distale IgM-associata risponde debolmente alla terapia immunosoppressiva (Mygland A e Monstad P. 2003).

Altre varianti cliniche sono: *polineuropatia demielinizante infiammatoria cronica assonale*, la *polineuropatia demielinizante infiammatoria cronica puramente sensitiva* (Saperstein DS et al., 2001), e *polineuropatia demielinizante infiammatoria cronica puramente motoria e assonale* (quale viene denominata anche assonopatia motoria acquisita multifocale) (Katz JS et al., 2002).

La polineuropatia demielinizante infiammatoria cronica può anche essere associata con malattie concomitanti come l'infezione con HIV (human immunodeficiency virus) oppure epatite C,

sindrome di Sjögren, malattia infiammatoria dell'intestino, melanoma, linfoma, diabete mellito, e gammopatia monoclonale di significato sconosciuto (MGUS) IgM, IgG, o IgA (Sander HW e Latov N, 2003). L'importanza patogenetica di tali malattie concomitanti non è chiara. Inoltre, in contrasto con la neuropatia demielinizzante distale simmetrica acquisita con paraproteinemia IgM, la presentazione clinica con ipostenia muscolare sia distale e prossimale è identica a quella della polineuropatia infiammatoria cronica classica, e le guidelines sono le stesse. L'associazione con il diabete mellito è di particolare interesse perché, secondo alcune stime, la CIDP si manifesta più comunemente nei pazienti con diabete, generando una notevole difficoltà diagnostica (Köller H et al., 2005).

Patogenesi della CIDP

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 A 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 rivolta verso un fattore stimolante, più frequentemente un organismo infettivo che condivide epitopi con i tessuti dell'ospite. Soltanto in casi rari, nelle CIDP sono stati identificati specifici bersagli in modo convincente. Inoltre, 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 (Köller H et al., 2005).

Esistono prove dell'attivazione delle cellule T nei pazienti con CIDP, anche se la specificità antigenica rimane largamente sconosciuta (Köller H et al., 2005). Da studi di campioni di biopsia del nervo e modelli animali, emerge che i linfociti T attivati possono invadere il tessuto del nervo periferico. Le popolazioni di cellule T che sono stati identificati sono eterogenei, appartenendo sia al sottogruppo CD4 e CD8 (Köller H et al., 2005). Per generare lesioni infiammatorie del nervo, le cellule T attivate devono attraversare la barriera sangue-nervo, un processo complesso che

comprende homing, adesione, e migrazione (Gold R et al., 1999). Tale processo è favorito da alterazioni locali della barriera ematoencefalica (Kanda T et al., 2004), elevati livelli di molecole di adesione solubili (Previtali SC et al., 2001), chemochine (Kastenbauer S et al., 2003) e che si possono trovare nel siero o nel liquido cerebrospinale, o in entrambi. 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 α , interferone- γ , e interleuchina-2 (Gold R 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 (ad esempio radicali liberi dell'ossigeno, metaboliti dell'ossido nitrico, metaboliti dell'acido arachidonico, proteasi, e componenti del complemento) (Kiefer R et al., 2001) 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 (per esempio, transforming growth factor *b*) o altre molecole. È importante notare che l'ambiente immunitario locale dei nervi periferici sembra che faciliti l'apoptosi delle cellule T invadenti autoaggressive, un processo rafforzato dalla somministrazione terapeutica di corticosteroidi (Koller H et al., 2005).

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 I 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. Una neuropatia immunitaria spontanea con somiglianze cliniche, elettrofisiologiche e morfologiche alla CIDP negli umani si sviluppa nel topo diabetico non obeso che mancano della costimolazione B7-2 (Köller H et al., 2005).

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 e la presenza di bande oligoclonali IgG nel liquido cerebrospinale. 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 H et al., 2005). I gangliosidi e correlati glicolipidi possono anch'essi essere antigeni bersaglio. In pochi pazienti con CIDP, ci sono prove sierologiche di infezione recente con *Campylobacter jejuni* determinante fenomeni di mimetismo molecolare come

la causa basilare della CIDP (Melendez-Vasquez C et al., 1997). La reattività sierica contro presunti antigeni non mielinici nelle cellule di Schwann è stata recentemente descritta in 12 su 46 pazienti studiati (Kwa MS et al., 2003). La demielinizzazione e il blocco di conduzione possono anche essere conseguenza di costituenti del siero diversi da anticorpi diretti alla mielina, come le citochine, complemento, o altri fattori infiammatori (come l'ossido nitrico). La bassa frequenza di anticorpi specifici che viene osservata nei pazienti con CIDP suggerisce che diversi anticorpi e meccanismi separati sono coinvolti nei pazienti.

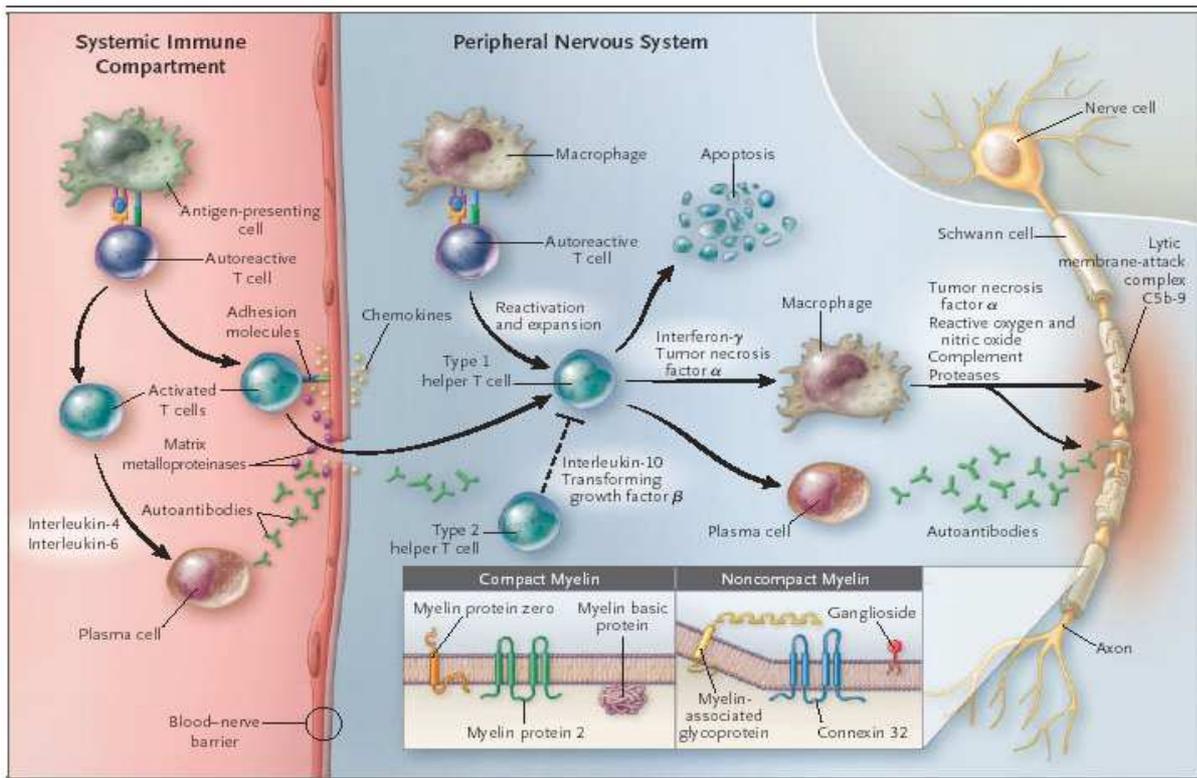


Figura 19. (Da Köller H et al., 2005) Immunopatogenesi della CIDP.

Una illustrazione schematica dei principi base della risposta immunologia cellulare ed umorale dimostra che cellule T autoreattive riconoscono un antigene specifico nel contesto del complesso maggiore istocompatibilità di classe II e molecole costimolatorie sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (macrofagi) nel compartimento immunitario sistemico. Un'infezione può innescare questo evento attraverso il mimetismo molecolare, una cross-reazione verso gli epitopi condivisi tra l'agente microbiologico e antigeni dei nervi. Questi linfociti T attivati possono attraversare la barriera sangue-nervo in un processo che coinvolge molecole dell'adesione cellulare, metalloproteinasi della matrice, e chemochine. All'interno del SNP, le cellule T attivano i macrofagi che aumentano l'attività fagocitaria, la produzione di citochine, e il rilascio di mediatori tossici, includendo l'ossido nitrico, intermedi reattivi dell'ossigeno, metalloproteinasi della matrice, e citochine proinfiammatorie, includendo *Tnf- α* e *IFN- γ* . Autoanticorpi che attraversano la barriera sangue-nervo o che vengono prodotti localmente dalle cellule plasmatiche contribuiscono alla demielinizzazione e al danno assonale. Gli autoanticorpi possono mediare la demielinizzazione mediante una citotossicità cellulare anticorpo dipendente, bloccare funzionalmente epitopi funzionalmente rilevanti per la conduzione nervosa e attivare il complemento. La conclusione della risposta infiammatoria avviene mediante l'induzione dell'apoptosi delle cellule T e il rilascio delle citochine antiinfiammatorie, come l'interleuchina-10 e il transforming growth factor β .

La guaina mielinica è composta da varie proteine, come la proteina zero, che corrisponde a più del 50 per cento delle proteine totali della mielina del SNP; la proteina 2 della mielina; la proteina basica della mielina; le glicoproteine associate alla mielina; la connexina 32; e gangliosidi e glicolipidi correlati. Queste molecole sono state identificate come antigeni bersaglio per la risposta anticorpale con frequenza variabile nei pazienti con questa malattia.

Differenza nella immunopatogenesi e nella espressione di molecole pro infiammatorie tra GBS e CIDP.

GBS e CIDP sono entrambe malattie infiammatorie autoimmuni che determinano una demielinizzazione infiammatoria dei nervi periferici. Condividono caratteristiche istopatologiche quali infiltrati di linfociti CD4+ e CD8+ e di macrofagi attivati senza evidenza di attivazione delle cellule B e di deposito di immunoglobuline (Said G, 2006; Hughes RA e Cornblath DR, 2005). Tuttavia queste due patologie presentano importanti differenze nella presentazione clinica e nell'evoluzione, la prima presenta un esordio acuto con una polineuropatia sensitivo-motoria rapidamente progressiva che può essere molto grave (benché spesso sia autolimitante e risponda al trattamento con immunoglobuline con bassa probabilità di lasciare sequele neurologiche) mentre la CIDP ha una evoluzione cronica/recidivante con frequente progressione della disabilità e modesta risposta al trattamento.

La differenza tra le due patologie si basa sulla aggressione di cellule mononucleate contro la guaina mielinica dei nervi periferici che è acuta e transitoria nella GBS e cronica e persistente nella CIDP. Si può ipotizzare che una differente espressione di mediatori dell'infiammazione nel liquor cerebrospinale potrebbe avere un ruolo nel favorire una evoluzione cronica rispetto ad una acuta. Le biopsie dei nervi di pazienti con GBS e CIDP evidenziano entrambe l'espressione dei recettori per le chemochine CXCR3, CCR1, CCR2 e CCR5 suggerendo il ruolo patogenetico di CXCL10 (chemoattraente per i linfociti T), CCL2 (chemoattraente per i monociti e le cellule dendritiche) e per CCL5; inoltre CXCL10 è stato ritrovato elevato nel liquor di pazienti con GBS e CIDP (Kieseier BC et al., 2002). È stato dimostrato che i pazienti nella fase acuta della GBS hanno valori elevati di CCL2 e CXCL10 nel liquor, mentre i pazienti con CIDP hanno valori elevati di CCL23 (chemoattraente per cellule dendritiche mature e cellule T naive o attivate) e di CXCL10 (Press R et al., 2003). Altri studi hanno evidenziato che (IL)-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α e macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) erano tutte non espresse nel liquor delle CIDP mentre altri mediatori infiammatori come CXCL9, CXCL10 e CCL3 erano elevati (Sivieri S et al., 1997; Mahad DJ et al., 2002). In un modello animale di neurite autoimmune sperimentale l'espressione di CCL3 e CCL4 precedeva l'insorgenza dei sintomi mentre l'espressione di CXCL10, CCL5 e CCL2 coincideva con la massima espressione clinica (Kieseier BC et al., 2000). Pertanto dati da studi su animali e su pazienti confermano il coinvolgimento delle chemochine nel reclutamento e attivazione dei monociti e linfociti nella patogenesi sia della GBS e della CIDP ma non evidenziano una sostanziale differenza tra queste due malattie che possa giustificare la diversità del decorso clinico.

GAS6 E INFIAMMAZIONE

Il ruolo della proteina Gas6 come potenziale agente antiinfiammatorio è stato individuato, per la prima volta, nel 1998 quando è stato evidenziato che la proteina Gas6 era in grado di inibire l'adesione dei polimorfonucleati all'endotelio attivato da vari fattori proinfiammatori in esperimenti in vitro (Avanzi G et al., 1998).

Tyro 3, Axl e Mer, recettori di Gas6, sono espressi dai monociti-macrofagi. Mer ad esempio, è stato isolato su monociti circolanti e su macrofagi tissutali, ma non su granulociti, linfociti T e B (Graham DK et al., 1994). Allo stesso modo, anche Axl è stato isolato dai monociti-macrofagi ma non dagli altri leucociti (Neubauer A et al., 1994; Neubauer A et al., 1997). Studi di ibridazione in situ su sezioni di milza, linfonodi e timo, hanno dimostrato che gli mRNA per Tyro 3, Axl e Mer sono abbondanti in regioni popolate da macrofagi, mentre sono assenti nelle zone ricche di linfociti. Nella milza per esempio, gli mRNA per i tre recettori sono presenti nella polpa rossa e nella zona marginale, e al contrario non sono riscontrabili nel manicotto linfatico periarteriolare, nei centri germinativi e nella polpa bianca (Lu Q e Lemke G, 2001). I topi mutanti sui singoli geni codificanti uno dei recettori, presentano tra loro fenotipi diversi ma comunque patologici e affini (Lu Q et al., 1999; Lu Q e Lemke G, 2001). Tra i topi mono-mutanti (mutanti su uno solo dei geni per la famiglia Tyro 3), il fenotipo che più severamente si discosta dai topi wild, risulta il mutante Mer. Tale fenotipo è caratterizzato da retinite pigmentosa e cecità (D'Cruz PM et al., 2000; Gal A et al., 2000) aumentata sensibilità all'LPS e conseguente shock endotossico, e una ritardata clearance delle cellule apoptotiche (Camenish TD et al., 1999; Cohen PL et al., 2002). I topi knockout per il recettore Tyro 3, mostrano invece una compromissione del sistema nervoso centrale, che si manifesta con LTP (diminished hippocampal long-term potentiation) quando sono giovani, e con degenerazione neurale accompagnata da scosse, tremori e hindlimb paralysis in età più adulta (Lu Q et al., 1999).

Le mutazioni doppie (su due geni per altrettanti recettori della famiglia Tyro 3) portano a difetti più gravi rispetto alle mutazioni singole, e le mutazioni triple (fenotipo TAM) ne portano di ancora più gravi (Lu Q et al., 1999; Lu Q e Lemke G, 2001), si evince pertanto che esiste un effetto cumulativo. È importante notare tuttavia, che persino i topi TAM sopravvivono all'embriogenesi e non presentano nessun tipo di disturbo dello sviluppo. Infatti, per le prime due o tre settimane dalla nascita, questi topi appaiono indistinguibili dai topi wild (Lu Q et al., 1999; Lu Q e Lemke G, 2001). Questo è una caratteristica peculiare, in quanto molte mutazioni su singoli geni per recettori PTK sono letali già durante l'embriogenesi. Al contrario i fenotipi mutanti per la famiglia Tyro 3 presentano disordini per lo più a carattere cronico, a carico del sistema immunitario, vascolare,

nervoso e riproduttivo (Lu Q et al., 1999; Lu Q e Lemke G, 2001). Le prime manifestazioni che rendono questi mutanti riconoscibili, compaiono tipicamente quando inizia la maturazione sessuale, vale a dire attorno alla quarta settimana di vita (Lu Q et al., 1999; Lu Q e Lemke G, 2001).

I topi con mutazione singola sul gene per Mer, sviluppano per prima cosa cecità, per degenerazione completa dei fotorecettori, intorno all'ottava settimana (Lu Q et al., 1999), e i maschi TAM raggiungono infertilità per degenerazione di tutte le cellule germinali del testicolo, pressappoco con gli stessi tempi (Lu Q et al., 1999). Anche molte femmine TAM sono infertili, ma non tutte. Entrambi i sessi sono inclini a subire violente scosse a partire dalla quarta settimana, questo vale anche per i mutanti per Tyro 3 singolo, ma i fenotipi TAM presentano le forme più eclatanti, e in età più avanzata sono paralizzati (Lu Q et al., 1999).

I cervelli dei topi con questi sintomi presentano perdita neuronale diffusa ed encefalopatia spongiforme pronunciata. Tuttavia nonostante le evidenze istologiche e cliniche, questi tessuti che degenerano non esprimono i recettori in esame (Lu Q e Lemke G, 2001). Ovvero, anche se i fenotipi Mer, presentano caratteristicamente danno alla retina, i fotorecettori dei topi normali sono Mer negativi, ma è l'epitelio fagocitico pigmentato della retina, a cui i fotorecettori sono intimamente connessi, ad esprimere Mer (D'Cruz PM et al., 2000). Allo stesso modo, sono le cellule di Sertoli ad esprimere Mer, Axl e Tyro 3, e non le cellule germinali del testicolo, che appaiono degenerate nel fenotipo TAM (Lu Q et al., 1999). Tuttavia il disordine più drammatico dei topi TAM, è quello a carico del sistema immunitario (Lu Q e Lemke G, 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. Anche se milza e linfonodi iniziano a crescere già dalla quarta settimana di vita, questi raggiungono dimensioni abnormi all'incirca intorno al sesto mese, ed entro un anno la milza dei topi TAM è dieci volte quella dei topi wild e la linfadenopatia è pronunciata e diffusa. Ciascuno dei tre recettori della famiglia contribuisce a tale fenomeno, ma è Mer quello che ha un peso maggiore (Lu Q e Lemke G, 2001). Una caratteristica classica dei topi TAM, è quella della proliferazione aberrante dei linfociti T e B, con un rapporto T/B e $CD4^+/CD8^+$ aumentato (Lu Q e Lemke G, 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 Q e Lemke G, 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 (ad es. CD 69, IFN- γ , FAS, IL-2 receptor) e cronica (ad es. CD44). L'attivazione costitutiva del sistema immunitario e la degenerazione di diversi tessuti non immunitari conduce allo sviluppo dell'ampio spettro delle manifestazioni autoimmuni dei topi TAM, le quali sono sovrapponibili alle più comuni malattie autoimmunitarie dell'uomo: artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico, sindrome di

Sjögren e pemfigo volgare (Lu Q e Lemke G, 2001; Lemke G e Lu Q, 2003). E, come accade per molti dei disordini immunitari nell'uomo, le femmine TAM sono più colpite rispetto ai maschi (Lu Q e Lemke G, 2001). Tali manifestazioni cliniche sono accompagnate da titoli anticorpali sierici elevati, diretti contro un'ampia gamma di autoantigeni, che comprendono dsDNA, collagene e fosfolipidi di membrana (Lu Q e Lemke G, 2001). Anche se i titoli anticorpali sono variabili tra i membri di un dato genotipo, generalmente i livelli dei mutanti su due geni sono più elevati rispetto a quelli dei mutanti su un gene singolo, e quelli dei TAM sono ancora più alti (Cohen PL et al., 2002; Lu Q e Lemke G, 2001). Anche se i linfociti, in questi mutanti, sono iperattivi, iperproliferanti e vanno a formare colonie nei tessuti non linfatici, non esprimono i recettori Tiro 3, Axl e Mer, che sono invece espressi caratteristicamente da monociti, macrofagi e cellule dendritiche (Lemke G e Lu Q, 2003). In effetti se si trasferiscono cellule B e T da un topo wild ad uno TAM, queste cellule adottano un aspetto TAM (Lemke G e Lu Q, 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. Ovvero sarebbero componenti fondamentali di un processo finalizzato a resettare il sistema immunitario alle condizioni di base qualora l'insulto (il patogeno o la tossina) sia stato neutralizzato (Figura 20).

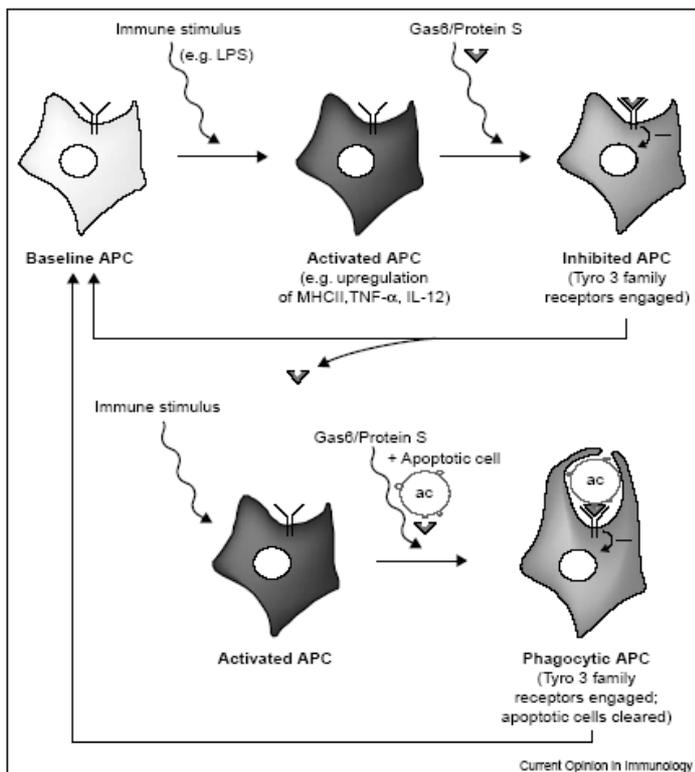


Figura 20. (da Lemke G e Lu Q, 2003) La figura mostra l'effetto inibitorio che il legame di Gas6 con i propri recettori sulle cellule APC (macrofagi e cellule dendritiche) porta a tali cellule qualora queste siano state attivate da un stimolo infiammatorio. Pare che l'azione di Gas6 possa portare le cellule APC attivate allo stato stazionario spegnendo la risposta stessa. Inoltre illustra l'ipotesi che il legame di Gas6 con i propri recettori possa condurre alla fagocitosi di cellule apoptotiche da parte delle APC, probabilmente perché Gas6 è in grado di legare componenti della membrana citoplasmatica esposte dalle cellule in apoptosi.

Diverse osservazioni sui mutanti Mer e TAM rafforzano questa ipotesi. Queste comprendono:

- 1) i macrofagi ottenuti da mutanti Mer, quando stimolati con LPS, esprimono livelli inusualmente alti di nuclear factor (NF)- κ B, e i topi sono ipersensibili allo shock endotossico, al danno tissutale e alla morte dovuti al picco di TNF- α LPS-indotto (Camenish TD et al., 1999; Cohen PL et al., 2002). Questo fenomeno è più pronunciato nei topi TAM (Lu Q e Lemke G, 2001).
- 2) 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 mutanti, che producono anche livelli più elevati di citochine infiammatorie (comprese TNF- α e IL-12) (Lu Q e Lemke G, 2001).

La seconda caratteristica fondamentale che contribuisce a formare il quadro clinico dei mutanti è rappresentata dall'alterazione della fagocitosi. Questa è una caratteristica che si osserva maggiormente nei mutanti Mer (Cohen PL et al., 2002). Quando i macrofagi prelevati da mutanti Mer sono testati con timociti, nei quali è stata indotta apoptosi, questi si dimostrano lenti e scarsamente efficienti nel fagocitare le cellule morte. Tale ritardo sembra specifico per le cellule apoptotiche, e non si riflette sulla funzionalità della fagocitosi in generale (Cohen PL et al., 2002). Il ritardo nella fagocitosi delle cellule apoptotiche sembra spiegato dal fatto che normalmente i recettori della famiglia Tyro 3 riconoscono la fosfatidilserina attraverso il proprio dominio Glu amino-terminale (Nakano T et al., 1997). Questo lipide, normalmente, è espresso sulla faccia interna della membrana plasmatica, e quindi viene esposto all'esterno solo quando la cellula va in lisi. Il legame dominio amino-terminale-mediato tra questo lipide e Gas6, il quale a sua volta può legare i propri recettori (Tyro 3, Axl e Mer), dirige i macrofagi al riconoscimento delle cellule apoptotiche e alla loro successiva fagocitosi. Analisi condotte sui topi mutanti Mer, suggeriscono fortemente che la fagocitosi sia strettamente dipendente dall'attività chinasi dei recettori della famiglia Tyro 3 (Cohen PL et al., 2002).

Così queste due aberrazioni costituiscono le componenti necessarie e sufficienti per tutte le manifestazioni patologiche autoimmuni dei fenotipi mutanti per la famiglia Tyro 3, compresa la degenerazione intrinseca tissutale accompagnata dall'apoptosi riscontrabile nella retina, nel testicolo, nel cervello, e negli altri siti colpiti, a dimostrazione del fatto che il segnale trasmesso da questi recettori svolge un ruolo essenziale per mantenere l'omeostasi e il corretto funzionamento del sistema immunitario (Lemke G e Lu Q, 2003).

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

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

Recenti studi hanno ulteriormente approfondito il meccanismo tramite cui la mancanza di uno o più recettori di Gas6 possa determinare l'attivazione macrofagica. Recentemente è stato dimostrato che le cellule apoptotiche inibiscono la produzione di citochine proinfiammatorie da parte delle cellule dendritiche tramite l'attivazione di Mer. Mer quindi attiverebbe il sistema PI3K/AKT determinando in ultimo l'inibizione dell'IKK (chinasi di I κ B), inibendo la liberazione di NF κ B dal complesso con I κ B e quindi inibendone la sua traslocazione nel nucleo con conseguente attivazione di trascrizione di geni di citochine proinfiammatorie tra cui il Tnf-alfa (Sen P et al., 2007).

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

Ulteriori studi hanno confermato il coinvolgimento della proteina Gas6 anche nei processi infiammatori/infettivi anche nell'uomo. Infatti Borgel D et al (2006) hanno descritto un incremento della concentrazione plasmatica di Gas6 nei pazienti affetti da sepsi severa, proporzionale alla gravità della sepsi.

Anche il nostro gruppo ha contribuito allo studio del ruolo della proteina Gas6 nei processi infiammatori nell'uomo e nella regolazione della attivazione macrofagica in vitro. In uno studio ove è stata valutata l'utilità del dosaggio plasmatico della proteina Gas6 nella diagnosi differenziale della dispnea acuta abbiamo infatti dimostrato che Gas6 è risultato significativamente aumentato nel plasma dei pazienti con un processo infettivo polmonare o sistemico in atto (Sainaghi PP et al., 2009). Inoltre abbiamo recentemente dimostrato che la proteina Gas6 inibisce la produzione di citochine pro infiammatorie (Tnf-alpha, IL-6, IL-1a) da parte di macrofagi umani e cellule U937 differenziate attivati con lipopolisaccaride attraverso la stimolazione del recettore Mer e l'attivazione a valle del segnale PI3K-AKT con inibizione di GSK3beta e inibizione della traslocazione di NF κ B nel nucleo (Alciato F et al., 2009).

GAS6 E MALATTIE INFIAMMATORIE DEMIELINIZZANTI DEL SISTEMA NERVOSO

I topi knockout per il solo recettore Tyro 3, mostrano una compromissione del sistema nervoso centrale, che si manifesta dapprima nei primi mesi con LTP (diminished hippocampal long-term potentiation), quindi con degenerazione neuronale accompagnata da clonie, tremori e paralisi degli arti in età più adulta (Lu Q et al., 1999).

Studi di espressione dell'mRNA della proteina Gas6, e dei suoi recettori Tyro-3, Axl, e Mer su ratti durante lo sviluppo embrionale hanno evidenziato che Gas6 viene espresso nel SNC iniziando dagli stadi embrionali tardivi e i suoi livelli raggiungono i livelli più alti nell'adulto (Prieto AL et al., 1999; Funakoshi H et al., 2002). Dei tre recettori nel SNC Tyro-3 è il più ampiamente espresso, con Axl e Mer individuati soltanto in un numero limitato di siti nel adulto. L'espressione di Tyro-3 è bassa nell'embrione ed aumenta in modo marcato durante gli stadi postnatali precoci, con un decorso nel tempo parallelo con quello della sinaptogenesi. Axl e Mer sono espressi a livelli bassi ma relativamente costanti durante tutto lo sviluppo (Prieto AL et al., 2000). Al 14° giorno di vita embrionale, Gas6 viene trovato nel cuore, vasi sanguigni, testicoli, plesso corioideo e nel midollo spinale ventrale. Nel adulto, Gas6 è espresso nella corteccia cerebrale, corteccia piriforme, e nel ippocampo (area CA1, CA3 e nel giro dentato). Viene altrettanto espresso nelle strutture del talamo ed ipotalamo, mesencefalo, e nei nuclei motori e trigeminali. Nel cervelletto, viene espresso nei neuroni del Purkinje e nei nuclei cerebellari profondi, inoltre, tutti i tre recettori si trovano nelle cellule Purkinje, e Tyro-3 è altrettanto individuato nei neuroni granulari e glia di Bergmann. I tre recettori sono espressi anche nella sostanza bianca cerebellare, principalmente durante la mielinizzazione. Siccome, Gas6 è espresso diffusamente nello strato cellulare piramidale, potrebbe attivare queste cellule in modi sia autocrino sia paracrino (Prieto AL et al., 1999; Prieto AL et al., 2000). Si è visto inoltre che Gas6 e Tyro-3 espressi nel SNC del ratto adulto sono regolati in modo simile durante lo sviluppo (Funakoshi H et al., 2002).

Le loro funzioni fisiologiche nel SNC di Gas6 e dei suoi recettori non sono ben comprese, malgrado la loro potenziale importanza, che viene suggerita dalle caratteristiche strutturali di Tyro3 e dalla sua espressione predominante nell'encefalo. Per capire queste funzioni sono stati condotti alcuni studi su colture cellulari di neuroni dell'ippocampo dei ratti. Gas 6 ricombinante di ratto protegge i neuroni dell'ippocampo dall'apoptosi indotta dalla deprivazione del siero in vitro, indicando che Gas6 è un fattore favorente la sopravvivenza per questi neuroni (Funakoshi H et al., 2002).

Ulteriori esperimenti in vitro hanno confermato un ruolo di Gas6 nel favorire la sopravvivenza cellulare di altre specie neuronali. È risultato infatti che Gas6 protegge dall'apoptosi i neuroni corticali di topo indotti in apoptosi dalla proteina β amiloide e da PLA2-IIA inibendo la

condensazione della cromatina e la frammentazione del DNA. Il fatto che le colture cellulari di questi studi contenevano poche cellule non neuronali indica che Gas6 esercita un effetto neuroprotettivo diretto e non indirettamente attraverso le cellule di supporto (Yagami T et al., 2002; Yagami T et al., 2003). Tale effetto risulta di una certa importanza in quanto l'accumulo della β amiloide nel cervello è un aspetto caratteristico della malattia dell'Alzheimer invece PLA2-IIA viene espressa nella corteccia cerebrale in seguito ad eventi ischemici (Yagami T et al., 2002; Yagami T et al., 2003). Prima della morte cellulare, l'amiloide e PLA2-IIA aumentano l'influsso del Ca^{2+} via L-VSCC nelle cellule neuronali inducendo neurotossicità (Yagami T et al., 2003). Sia A β sia PLA2-IIA causano la morte dei neuroni in modo concentrazione e tempo dipendente. Un'azione antiapoptotica di Gas6 è stata descritta nei topi anche nei confronti dei neuroni secernenti GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) attraverso la cascata ERK e PI3-K (Allen MP et al., 1999; Allen MP et al., 2002).

Analisi di Microarray hanno inoltre rivelato che trascritti per i recettori tirosin-chinasi Axl e Mer sono espressi ad alti livelli nei oligodendrociti isolati nel midollo spinale fetale umano del secondo trimestre (Shankar et al., 2003). Uno studio fatto da Shankar et al., 2003 ha evidenziato che colture cellulari di oligodendrociti umani CNP^+ e MBP^+ del midollo spinale fetale trattati con rhGas 6 sono protetti dall'apoptosi e presentano più processi primari e arborizzazioni rispetto a quelli non trattati. L'effetto viene abolito in presenza del recettore solubile Axl-FC (Shankar et al., 2003). L'attivazione recettoriale mediata da Gas6 conduce alla cascata PI3-kinase/Akt. Questo è stato confermato anche dal fatto che inibitori di PI3-kinase bloccano l'effetto anti-apoptotico del rhGas6 (Shankar SL et al., 2003).

L'espressione di Gas6 nei neuroni spinali motori, nei neuroni delle radici gangliari dorsali e nell'embrione in sviluppo sono compatibili con un ruolo di Gas6/Axl nello sviluppo del sistema nervoso e riparazione dopo danno del midollo spinale (Li R et al., 1996). Tale espressione è particolarmente intensa nelle corna anteriori che contengono i motoneuroni. Gas6 stimola la crescita delle cellule di Schwann umane, aumentando sia il numero delle cellule, sia l'incorporazione di timidina triziata, e ha effetti sinergici con altri mitogeni delle cellule di Schwann quali il fattore di crescita gliale, eregulina e forskolin. Gas6 stimola le cellule di Schwann umane in un modo dose-dipendente con un effetto significativo visto ad 1ng/ml (14PM) e il massimo effetto tra 10-30 ng/ml. Le colture cellulari di cellule di Schwann umane contengono sia recettori Axl sia Mer e la loro fosforilazione avviene in presenza di Gas6. L'attivazione di tali recettori sulle cellule di Schwann da parte di Gas6 è altamente specifica. Studi sul danno del nervo sciatico indicano un

aumento del Axl dopo il danno, suggerendo un ruolo nella sopravvivenza e protezione verso l'apoptosi (Li R et al., 1996).

Pertanto sia studi condotti su colture cellulari del sistema nervoso centrale sia quello periferico dimostrano che Gas6 non solo è un importante fattore antiapoptotico per colture neuronali ma anche per le cellule coinvolte nei processi di mielinizzazione infatti Gas6 inibisce l'apoptosi degli oligodendrociti (Shankar SL et al., 2003) e delle cellule di Schwann inoltre inducendo anche la proliferazione di queste ultime (Li R et al., 1996).

Un recente studio condotto dal gruppo di Kilpatrick (Binder MD et al, 2008) ha evidenziato come i topi Knock out per il gene di Gas6 fossero maggiormente suscettibili alla demielinizzazione nel modello animale da cuprizone. In questo modello questa sostanza che svolge la funzione di chelatore del rame somministrata per os ai ratti determina una demielinizzazione progressiva con tossicità diretta sugli oligodendrociti in assenza di infiltrazione infiammatoria T-mediata con successivo reclutamento di cellule della microglia e di macrofagi; in considerazione del fatto che l'apoptosi degli oligodendrociti e la proliferazione della microglia sono entrambe eventi frequenti nelle fasi iniziali della demielinizzazione della SM, tale modello simula bene questa fase (Binder MD e Kilpatrick TJ, 2009). In questo contesto i topi Knock out per il gene gas6 presentavano sia riduzione della proliferazione microgliale sia una maggior apoptosi degli oligodendrociti con conseguente ritardo nella remielinizzazione.

Un altro recente studio (Weinger JG et al., 2009) condotto su reperti autoptici di pazienti affetti da SM deceduti per altre cause ha permesso di identificare che l'espressione dei recettori di Gas6 Mer e Axl nella loro forma solubile era incrementata nelle lesioni sia croniche attive sia silenti. Tuttavia mentre nel tessuto cerebrale normale l'espressione di Gas6 è proporzionale a quella dei suoi recettori solubili (sAxl e sMer) questo rapporto viene ad essere perso nelle lesioni croniche della SM ove all'incremento notevole dei recettori solubili non si associa un incremento proporzionale nella espressione di Gas6. In considerazione del fatto che i recettori solubili del Gas6 hanno la funzione di legare tale proteina impedendone il legame con i recettori di membrana funzionali, tale reperto sembrerebbe evidenziare come le lesioni croniche demielinizzanti potrebbero essere favorite da un insufficiente signaling Gas6-recettori.

SCOPO DEL LAVORO

Le malattie infiammatorie con patogenesi autoimmunitaria interessanti il sistema nervoso centrale e periferico presentano manifestazioni cliniche eterogenee e la loro diagnosi è spesso complessa. Tali patologie, inoltre, hanno, spesso, eziologia ignota.

Gas6 è una proteina di 75kDa scoperta nell'uomo nel 1993 (Manfioletti G et al., 1993), la cui funzione è tuttavia ancora poco conosciuta. Diversi studi hanno dimostrato la presenza di Gas6 e dei suoi recettori nel sistema nervoso centrale e periferico. A tale proteina è stato riconosciuto sia un ruolo neurotrofico e proliferativo sia antiapoptotico nei confronti di oligodendrociti, cellule di Schwann e in svariate popolazioni neuronali (neuroni dell'ippocampo, neuroni GnhRh dell'ipotalamo, neuroni corticali cerebrali e cerebellari). Infine l'espressione del mRNA di Gas6 e dei suoi recettori interessa diffusamente la corteccia cerebrale, cerebellare e dell'ippocampo nei ratti e nei topi sia durante lo sviluppo embrionale sia nell'età adulta con possibili importanti implicazioni nella sopravvivenza di queste popolazioni cellulari soprattutto durante lo sviluppo embrionale (Allen MP et al., 1999; Allen MP et al., 2002; Funakoshi H et al., 2002; Li R et al., 1996; Prieto AL et al., 1999; Prieto et al., 2000; Shankar SL et al., 2003; Shankar SL et al., 2006; Yagami T et al., 2002; Yagami T et al., 2003).

Pertanto il sistema Gas6/recettori tirosin kinasi sembrerebbe essere importante nel controllo della sopravvivenza di alcuni tipi cellulari neuronali e gliali in particolare le cellule della guaina mielinica del sistema nervoso centrale e periferico.

Gas6 inoltre è stato dimostrato essere coinvolto nei processi infiammatori in modelli animali ed in vitro. Infatti Gas6 è stato dimostrato inibire l'adesione dei polimorfonucleati all'endotelio attivato da stimoli proinfiammatori (Avanzi et al., 1998). Inoltre i topi knockout per i recettori Tyro3, Mer e Axl sviluppano iperplasia e iperattivazione linfocitaria presentando quadri di autoimmunità tipo vasculite con sindromi AR, LSE, Sjogren like con autoanticorpi e manifestazioni trombotico/emorragiche cerebrali. In considerazione del fatto che i linfociti non esprimono né i tre recettori, né il Gas6 mentre i monociti/macrofagi esprimono sia il ligando sia i recettori 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) parrebbe essere coinvolto nella regolazione della risposta immunitaria linfocitaria tramite le cellule monocito-macrofagiche (Lu Q e Lemke G, 2001; Lemke G e Lu Q, 2003). Tale ipotesi si è confermata in lavori successivi in cui è stato dimostrato che le cellule apoptotiche inibiscono la produzione di citochine proinfiammatorie da parte delle cellule dendritiche

tramite l'attivazione di Mer, PI3K/AKT determinando l'inibizione dell'IKK (chinasi di I κ B), inibendo la traslocazione di NF κ B (Sen et al., 2006). Inoltre il nostro gruppo ha recentemente dimostrato che la proteina Gas6 inibisce la liberazione di TNF- α , IL-6 e IL-1 α da parte di macrofagi attivati con lipopolisaccaride attivando il recettore Mer e conseguentemente PI3K/AKT con inattivazione di GSK3 β e inibizione della traslocazione dell' NF κ B nel nucleo (Alciato F et al., 2009).

Infine recenti evidenze hanno confermato il possibile coinvolgimento della proteina Gas6 nella patogenesi della Sclerosi multipla, infatti i topi Knock out per il gene di Gas6 sono risultati maggiormente suscettibili alla demielinizzazione nel modello animale da cuprizone presentando sia aumento della infiltrazione microgliale sia una maggior apoptosi degli oligodendrociti con conseguente ritardo nella remielinizzazione (Binder MD et al, 2008). Inoltre in reperti autoptici di pazienti affetti da SM deceduti per altre cause è stato evidenziato uno squilibrio tra l'espressione di Gas6 che è proporzionale a quella dei suoi recettori solubili (sAxl e sMer) nell'encefalo normale mentre questo rapporto viene ad essere perso nelle lesioni croniche della SM ove all'incremento notevole dei recettori solubili non si associa un incremento proporzionale nella espressione di Gas6 (Weinger JG et al., 2009).

Sulla base di queste premesse, è ipotizzabile che Gas6 con i suoi recettori partecipi attivamente nella patogenesi delle malattie autoimmuni infiammatorie croniche umane del sistema nervoso centrale e periferico

Pertanto con il presente studio ci proponiamo di valutare l'effettiva espressione della proteina Gas6 nel liquor cerebrospinale umano e le eventuali differenze di concentrazione di tale proteina in varie malattie neurologiche infiammatorie/autoimmuni sia del sistema nervoso periferico (CIDP, GBS) sia centrale (Sclerosi Multipla).

PAZIENTI, MATERIALI E METODI

Pazienti

Prima parte: valutazione del ruolo della proteina Gas6 nelle polineuropatie demielinizzanti del sistema nervoso periferico.

Abbiamo analizzato 273 campioni di liquor provenienti dall'archivio della Clinica Neurologica dell'Università del Piemonte orientale "A. Avogadro" raccolti dal 1999 al 2006 da puntura lombare eseguita per scopo diagnostici e conservati a - 30 ° C. Ogni paziente ha fornito un consenso informato scritto prima della puntura lombare per l'utilizzo del liquor per la valutazione sperimentale.

Per essere inclusi nello studio, tutti i pazienti dovevano inoltre presentare età > 18 e avere le seguenti diagnosi neurologiche: sindrome di Guillain-Barré (GBS), polineuropatia cronica infiammatoria demielinizzante (CIDP), altre malattie neurologiche non-infiammatorie/non-autoimmuni (NINAD) come ictus ischemico, epilessia, sclerosi laterale amiotrofica (SLA), cefalea, disturbi psichiatrici simulanti malattie neurologiche o vertigini otologiche.

Abbiamo escluso inoltre tutti i casi in cui vi fosse una diagnosi di malattia neurologica infettiva (meningite, encefalite, malattie da prioni), in cui il liquor presentasse caratteristiche emorragiche, tutti i casi la cui revisione della documentazione clinica non permetteva di formulare una diagnosi definitiva o i casi in cui non vi fossero le informazioni biochimiche del liquor. In questa prima fase dello studio non abbiamo inoltre considerato le malattie demielinizzanti del sistema nervoso centrale, considerate nella fase successiva.

Tutte le diagnosi sono state confermate dalla valutazione degli esami clinici, strumentali e di dati di laboratorio da parte di due neurologi indipendenti.

In particolare, abbiamo adottato i criteri diagnostici dell'Academy of Neurology CIDP (AAN, 1991) ed i criteri di Asbury per la diagnosi di GBS (Asbury AK e Cornblath DR, 1990).

Seconda parte: valutazione del ruolo della proteina Gas6 nei pazienti con Sclerosi Multipla

Tale parte dello studio è stata condotta in collaborazione con i medici del Centro Sclerosi Multipla dell'Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro", in particolare con il Dott. M.A. Leone e le dott.sse L. Collimedaglia e P. Naldi.

Abbiamo misurato la concentrazione liquorale e plasmatica di Gas6 in pazienti affetti da Sclerosi Multipla già reclutati alla diagnosi in un database clinico-biologico. Di tutti i pazienti reclutati in tale database, le cui modalità di reclutamento e raccolta dati sono descritte successivamente, abbiamo considerato solo quelli il cui liquor (e plasma se disponibile) fosse stato, previo consenso informato, raccolto e conservato a -20°C. Inoltre abbiamo considerato eligibili solo i pazienti in cui la rachicentesi fosse stata eseguita durante una poussée in atto entro 90 giorni dall'esordio dei sintomi e prima della risoluzione della poussée stessa e in cui non fosse stata ancora somministrata alcuna terapia. Rispondevano a tali requisiti 65 pazienti su un totale di 95 reclutati.

Qui di seguito viene illustrata la modalità con cui questo archivio è stato costituito.

Dal 1 gennaio 2001 al 31 dicembre 2006 sono stati reclutati consecutivamente 95 pazienti con CIS (Clinically Isolated Syndrome) e SM-RR (Sclerosi Multipla-Relapsing Remitting) afferenti al Centro Sclerosi Multipla della Clinica Neurologica dell'Università degli Studi del Piemonte Orientale "A. Avogadro" di Novara. La diagnosi di SM era stata formulata in accordo con i criteri diagnostici di McDonald (2001). Sono stati esclusi i pazienti con una diagnosi di SM primaria progressiva.

I pazienti sono stati arruolati nello studio al primo contatto con il Centro sia al primo attacco, ossia all'esordio di malattia sia a distanza dal I attacco. Venivano eseguiti: RMN encefalo e/o midollo, puntura lombare e altre indagini per escludere diagnosi alternative. Il paziente, dopo la prima visita, veniva valutato ogni 6 mesi fino alla fine del follow-up (30 giugno 2009). I pazienti venivano inoltre valutati entro tre giorni ogni qualvolta presentavano una ricaduta e seguivano una rivalutazione clinica dopo terapia sintomatica steroidea, circa un mese dopo.

Un medico del Centro Sclerosi Multipla era responsabile delle visite programmate; altri due medici si occupavano, in caso di ricaduta, di compilare una scheda comprensiva di tutte informazioni sulle caratteristiche cliniche di ogni recidiva.

Pertanto per ogni ricaduta di ogni paziente sono state raccolte:

- la data e la modalità di osservazione della ricaduta, cioè di reperibilità delle informazioni cliniche che poteva avvenire direttamente con visita oppure tramite telefonata o anamnestica (durante la visita). Anamnestica: il paziente veniva a visita di controllo, programmata a priori, riferendo una recidiva precedente al I contatto con il Centro o intercorsa tra due valutazioni

neurologiche programmate, generalmente di intensità lieve tanto da non ritenere utile comunicarla al Centro, non trattata o trattata sua sponte con terapia steroidea. In questo caso le informazioni sulle caratteristiche della ricaduta venivano raccolte, sempre con l'aiuto del paziente, retrospettivamente, senza una valutazione obiettiva. Visita neurologica ambulatoriale: il paziente giungeva a visita, generalmente non programmata, in seguito all'insorgenza di una ricaduta clinica; in questo caso la recidiva veniva valutata obiettivamente dal Medico referente del Centro e compilata la prima parte della scheda poussée, che veniva poi completata durante le successive rivalutazioni neurologiche. Telefonata: il paziente, non potendo raggiungere il nostro Centro, comunicava la ricaduta telefonicamente; in tal caso un Medico referente del Centro acquisiva informazioni sulle caratteristiche della recidiva e compilava la prima parte della scheda poussée. Le recidive "sfuggite" alla valutazione obiettiva del Medico del Centro sono state "ricostruite" dalla cartella ambulatoriale.

- La valutazione dei sintomi neurologici avveniva tramite la scala EDSS e i singoli sistemi funzionali (piramidale, cerebellare, del tronco-encefalo, sensitive, sfinteriche, visive, mentali, altre). Per ogni ricaduta sono state rilevate per ogni sistema funzionale coinvolto (piramidale, cerebellare, del tronco-encefalo, sensitive, sfinteriche, visive, mentali, altre) la data di inizio del disturbo, la data di massima gravità (nadir), la data di inizio miglioramento e la data di massimo miglioramento. Inoltre per ogni paziente è stato valutato il punteggio di ogni sistema funzionale (SF) e dell'EDSS, all'inizio dei sintomi, al nadir e al massimo miglioramento.
- Informazioni su eventi precedenti la ricaduta quale la presenza di febbre, di infezioni, di vaccinazioni con le rispettive date, nonché il trattamento consigliato della ricaduta con le date di inizio di terapia, gli eventuali effetti collaterali o condizioni di sospensione dello schema terapeutico, costituivano l'ultima parte della scheda poussée. La terapia steroidea delle ricadute è stata standardizzata a seconda della gravità e del tipo di sintomi, prevedendo nessuna terapia per i pazienti che presentavano una sintomatologia lieve e non invalidante, una terapia steroidea per os in pazienti con una sintomatologia di media intensità o se presentavano solamente sintomi sensitivi e terapia endovenosa con ricovero per i pazienti che manifestavano sintomi clinicamente più gravi.

Grazie alle informazioni ottenute dalla scheda poussée è stato possibile calcolare per ogni ricaduta e per ogni sintomo la durata, la perdita di funzione neurologica durante la ricaduta, valutata come "guadagno" nel punteggio di ciascun SF e dell'EDSS (differenza tra la severità dei sintomi al nadir e prima della ricaduta) e le sequelae (differenza tra la severità dei sintomi al termine e prima della ricaduta).

Affidabilità dei dati. Al termine dello studio si è provveduto al controllo manuale di tutte le cartelle ambulatoriali e delle schede di valutazione della ricaduta al fine di individuare tutte le recidive per singolo paziente reclutato, evitando che alcune passassero inosservate.

Definizione di recidiva (incluso il primo attacco): un “evento acuto/subacuto di disabilità neurologica o un peggioramento di sintomi neurologici attribuibili alla SM della durata di almeno 24 ore dopo un periodo di almeno 30 giorni di miglioramento o stabilità”. Il peggioramento di sintomi neurologici già presenti associati a febbre non veniva considerata una ricaduta. Episodi transitori venivano considerati come ricaduta solo se presentavano una durata non inferiore delle 24 ore. Sintomi che insorgevano entro un mese dopo l’inizio della ricaduta venivano considerati come parte della stessa poussée (Schumacher GA, et al., 1965).

Valutazione delle sequele: per ogni FS è stata calcolata la differenza tra il punteggio alla data del massimo miglioramento e il punteggio prima dell’esordio della ricaduta (0 per il primo attacco); se la differenza era ≥ 1 veniva evidenziata una sequela neurologica (disabilità residua).

Inoltre per ogni paziente osservato durante il follow up dalle cartelle cliniche è stato ricavato il numero totale di ricadute dal reclutamento all’ultima visita di follow up e l’ultimo punteggio EDSS disponibile. A tale proposito, 13 pazienti sono stati persi al follow up. Dei restanti 52 pazienti il follow up minimo è stato di 2,5 anni, medio di $5,9 \pm 1,8$ anni e mediano di 5,2 anni.

Materiali e Metodi

Dosaggio della proteina Gas6 su liquor e siero con metodo ELISA

Materiali

- Sistema E.L.I.S.A sandwich messo a punto e validato presso il Laboratorio di Immunologia Clinica per dosaggio di Gas6 sierico, plasmatico e modificato per il dosaggio liquorale (Alciato et al., 2008):
- 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), soluzione madre 0,2 $\mu\text{g/ml}$.
- Anticorpo biotinitato purificato per affinità goat anti-Gas6 (R&D), soluzione madre 0,1 $\mu\text{g/ml}$.
- rh-Gas6 standard soluzione madre 250 $\mu\text{g/ml}$ in PBS-BSA 0.1%. (Amgen, CA, USA, dono dott. B. Varnum)

- Albumina bovina (BSA) in polvere, (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA).
- Complesso Streptavidina-HRP (Menarini Diagnostic, Firenze)
- TMB soluzione (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA).
- PBS [20 x] (Phosphate Buffer Saline) (32 gr di Na₂HPO₄·2H₂O + 6 gr di NaH₂PO₄·2H₂O + 164 gr di NaCl in 900 ml di acqua distillata, pH aggiustato a 6,8-6,9 con HCl o NaOH, quindi portato ad 1 litro con acqua distillata ottenendo un pH tra 7,2 e 7,4)
- Soluzione di bloccaggio/incubazione: Albumina bovina sierica (BSA) 2.5% in PBS-Tween
- Soluzione di lavaggio PBS TWEEN 20 (PBS [1 x] + 0,05% di TWEEN 20)
- Acido solforico 1,8 M (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA.)

Metodo di dosaggio di Gas6

E.L.I.S.A (enzyme-linked immunoassay) sandwich. Il metodo prevede il legame di un anticorpo primario, il quale si lega al polistirene della piastra dopo incubazione overnight. L'anticorpo primario alla concentrazione di 350 ng/ml in PBS viene caricato sulla piastra e incubato overnight a temperatura ambiente. 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, albumina bovina sierica al 2.5% in PBS-Tween, che va ad occupare i siti di legame liberi del polistirene, in modo da saturare tutta la piastra. In questo modo il Gas6 da dosare può resistere al lavaggio solo se riconosciuta dal proprio anticorpo primario presente sulla piastra, e non ha possibilità di legare il polistirene perché tutti i siti sono saturi. I pozzetti vengono saturati con soluzione di bloccaggio per 2 ore. Si lava con PBS TWEEN. 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 diluizione migliore è risultata da valutazioni preliminari di 1:20 e la matrice più adatta in cui diluire i campioni è albumina bovina 2.5%. La curva standard viene costruita attraverso diluizioni successive con un fattore di diluizione fisso (2), in modo da ottenere otto valori noti di Gas6 con le seguenti concentrazioni: 2 – 1 – 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,067 – 0,038 ng/ml. I campioni (in quadruplicato) e la curva standard (sempre in duplicato) (50 µl per ogni pozzetto) vengono caricati sulla piastra incubati per 2 ore a temperatura ambiente su agitatore a 300 giri per minuto. Scaduto tale termine si lava nuovamente con PBS TWEEN e si caricano tutti i pozzetti con l'anticorpo biotinilato purificato per affinità goat anti-Gas6 (R&D) alla concentrazione di 15 ng/ml in soluzione di incubazione. Questo riconosce il Gas6 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 e 30 minuti a temperatura ambiente e poi 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. Il complesso streptavidina-perossidasi viene diluita fino a 400 ng/ml in soluzione di incubazione e viene incubata a temperatura ambiente per 15 minuti e si lava con PBS TWEEN. A questo punto si caricano tutti i pozzetti con TMB che in presenza di perossidasi coniugata alla streptavidina e si colora di 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 immuno-enzimatica. La piastra è pronta per la lettura delle assorbanze attraverso spettrofotometro (lunghezze d'onda di lettura 450 nm, lunghezza d'onda di correzione 570 nm). La costruzione matematica della curva viene effettuata attraverso il metodo di regressione 4PL (4 parameters logistic regression). La concentrazioni della proteina di Gas6 espressa in ng/ml viene ottenuta tramite interpolazione dell'assorbanza del campione con quella della curva standard per ogni punto della curva attraverso apposito software di calcolo.

Tutte le incubazioni avvengono in un volume di 50 µl per pozzetto fuorché per la reazione di bloccaggio (300 µl). Inoltre dopo la prima e la seconda incubazione i pozzetti vengono svuotati e lavati per 3 volte con soluzione di lavaggio e asciugati per aspirazione. Dopo le prime due incubazioni la procedura è identica eccetto il fatto che i lavaggi non sono più 3 ma 5.

Sono state confermate le misure di validazione del metodo eseguite su plasma umane anche su liquor con i seguenti parametri: valore medio di inter ed intra assay coefficient of variation (CV) inferiore al 10%; recovery medio (5 campioni) del 96% a 10 ng/ml e 98% a 20 ng/ml.

Analisi statistica

Tutti i dati sono stati analizzati con un software statistico adeguato (StatSoft). Per confronto di medie di campioni indipendenti per più di 2 gruppi abbiamo eseguito l'analisi della varianza ANOVA e test post-hoc di Tukey per campioni non omogenei. Per analisi di distribuzioni di frequenza è stato eseguito test χ^2 . Inoltre quando appropriato è stata eseguita analisi di regressione lineare.

RISULTATI

Prima parte: valutazione del ruolo della proteina Gas6 nelle polineuropatie demielinizzanti del sistema nervoso periferico.

Sessantacinque pazienti rispondevano ai criteri di inclusione nello studio (Tabella 7). 15 erano affetti da GBS, 10 da CIDP, 40 erano i controlli affetti da una malattia neurologica non infiammatoria non autoimmune (NINAD).

Gas6 è risultato rilevabile nel liquido cerebrospinale di pazienti con NINAD ad una concentrazione media di $6,5 \pm 2,4$ ng / ml ($M \pm SD$). La concentrazione media di Gas6 è stata omogenea in tutte le singole diagnosi NINAD (stroke ischemico, SLA, cefalea, epilessia, vertigine otologica e disturbi psichiatrici) (ANOVA: $df = 4$; $F = 2.1$; $p > 0,1$).

La concentrazione media di Gas6 è risultata differente tra i 3 gruppi principali di diagnosi (NINAD, GBS e CIDP) con analisi della varianza ANOVA statisticamente significativa (ANOVA: $df = 2$, $F = 13.3$, $p < 0,0001$). Nell'analisi post-hoc, i pazienti con CIDP presentavano una concentrazione media di Gas6 più elevata ($p < 0.005$ vs tutti gli altri gruppi). Le concentrazioni medie dei gruppi GBS e NINAD erano sovrapponibili (post hoc, $p > 0.5$) (Tabella 7 e Figura 21).

Abbiamo inoltre valutato se la concentrazione di Gas6 potesse essere influenzata da alcuni fattori di confondimento quali: età, concentrazione delle proteine totali nel liquor, rapporto tra la concentrazione delle proteine totali nel liquido cerebrospinale e nel plasma. I valori medi e le rispettive deviazioni standard per ogni variabile sono riportati nella tabella 7.

Come prevedibile sia nei liquor dei pazienti affetti da GBS sia in quelli affetti da CIDP abbiamo riscontrato una maggiore concentrazione di proteine totali rispetto ai controlli (NINAD) (post hoc, $p < 0,0009$) inoltre sempre nei pazienti affetti da CIDP e GBS abbiamo evidenziato un più alto rapporto di proteine totali tra liquido cerebrospinale e plasma (post hoc, $p < 0.02$) sempre rispetto ai pazienti NINAD; ambedue indici di una alterazione della permeabilità alle proteine della barriera emato-encefalica. L'età è risultata omogeneamente distribuita tra i gruppi di diagnosi (post hoc, $p = n.s.$).

È importante però evidenziare che nessuna di queste variabili (età, concentrazione proteine totali nel liquor e rapporto tra proteine liquorali e plasmatiche) è risultata avere un valor medio differente tra CIDP e GBS (Test post-hoc di Tukey $p > 0,1$), testimoniando che sia l'età dei pazienti con CIDP e GBS era paragonabile così come l'alterazione della permeabilità della barriera emato-encefalica; non giustificando così le differenze di concentrazione della proteina Gas6 nelle due patologie.

Diagnosi	N° pazienti	Età (anni)	Liquor Gas6 (ng/ml)	Proteine totali (liquor) (mg/dl)	Rapporto tra proteine totali liquorali e plasmatiche
NINAD	40	49.1±19.0	6.5±2.4	37.1±20.9	0.006±0.004
GBS	15	51.6±13.3	7.2±2.6	101.6±55.3	0.015±0.010
CIDP	10	66.1±16.4	11.5±1.7	126.0±71.5	0.019±0.013

Tabella 7. Caratteristiche cliniche e dei parametri misurati per i gruppi analizzati

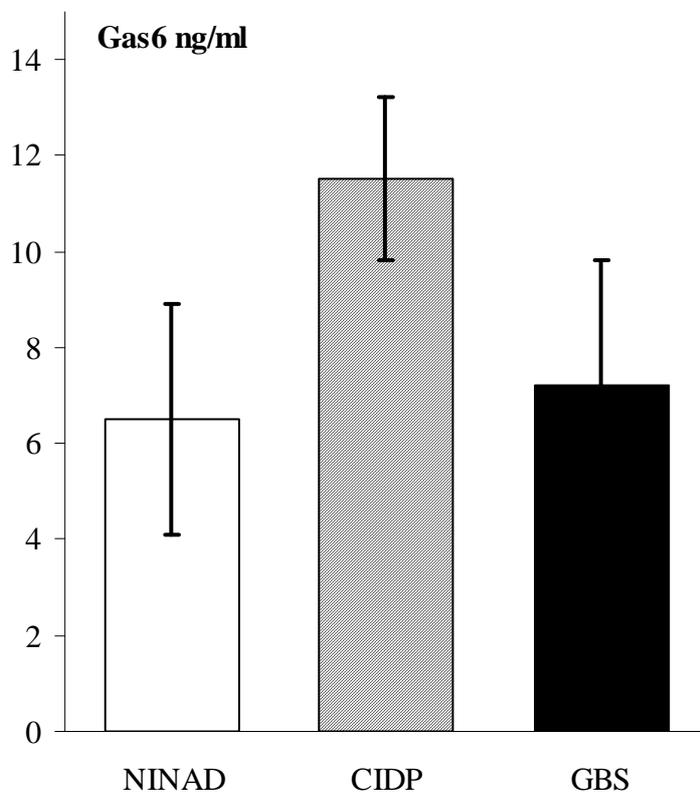


Figura 21. Concentrazione media e deviazione standard (barre di errore) della proteina Gas6 nel liquor cerebrospinale nei gruppi di diagnosi considerati. La concentrazione media di Gas6 risulta maggiore nei pazienti con CIDP rispetto agli altri gruppi (vedi testo). * indica che la concentrazione media è statisticamente differente verso gli altri gruppi (test Post-Hoc di Tukey, $p < 0.005$)

Ad ulteriore conferma del fatto che la concentrazione liquorale di Gas6 non fosse influenzata dall'età dei pazienti o dalla alterazione della permeabilità della barriera emato encefalica abbiamo eseguito l'analisi di regressione lineare tra la concentrazione liquorale di Gas6 e l'età dei pazienti, la concentrazione delle proteine totali nel liquor e il rapporto proteine totali liquorali/plasmatiche nei pazienti con NINAD. La concentrazione liquorale di Gas6 non è risultata correlare con alcuna di queste variabili (regressioni lineari, $p > 0.1$). (Figura 22).

Abbiamo infine valutato se la concentrazione liquorale di Gas6 potesse essere stata influenzata dalla durata di conservazione, in è stato evidenziato che la proteina Gas6 è poco resistente a cicli di congelamento/scongelo tanto da poterne ridurre la sua concentrazione (Alciato F, et al., 2008). Non abbiamo a tale proposito identificato alcuna alcuna relazione tra la concentrazione liquorale di Gas6 e la durata della conservazione del campione (anni) (regressione lineare, $R^2 = 0.01$, $p > 0,1$).

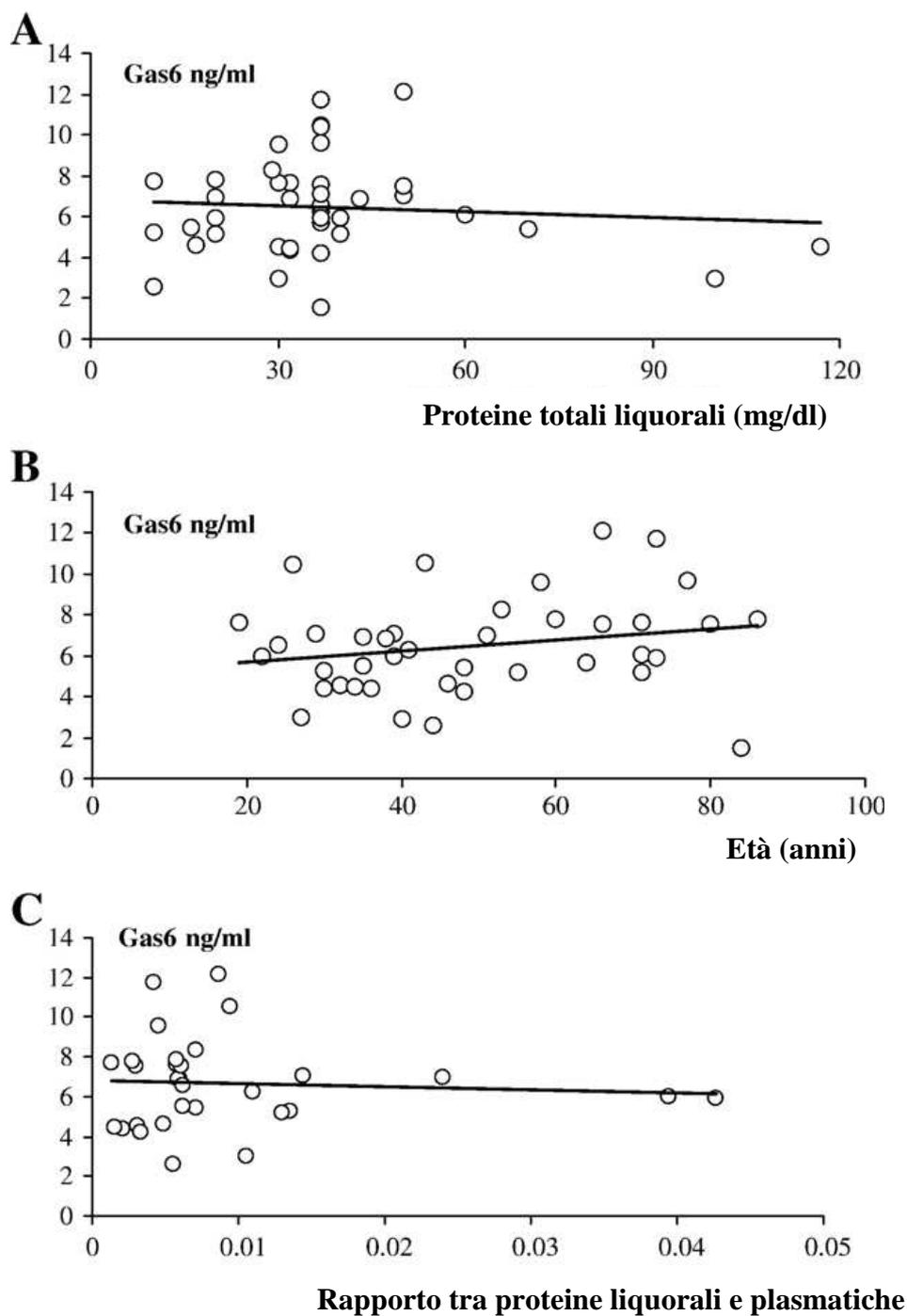


Figura 22: Analisi di regressione lineare tra possibili fattori di confondimento e la concentrazione liquorale di Gas6 nei pazienti con NINAD. A, regressione tra le concentrazioni liquorali di proteine totali e di Gas6; Concentrazione liquorale di Gas6 = $6.8 - 0.01 * \text{concentrazione liquorale proteine totali}$; $R^2 = 0.01$, n.s. ($p > 0.1$). B, regressione tra età e concentrazione liquorale di Gas6; Concentrazione liquorale di Gas6 = $5.1 + 0.03 * \text{Età}$; $R^2 = 0.05$, n.s. ($p > 0.1$). C, regressione tra il rapporto delle concentrazioni liquorale e plasmatica delle proteine totali e la concentrazione liquorale di Gas6; Concentrazione liquorale di Gas6 = $6.8 - 14.8 * \text{rapporto delle concentrazioni liquorale e plasmatica delle proteine totali}$; $R^2 = 0.004$, n.s. ($p > 0.1$).

Seconda parte: valutazione del ruolo della proteina Gas6 nei pazienti con Sclerosi Multipla

Abbiamo valutato i valori di concentrazione su siero e liquor della proteina Gas6 nei pazienti affetti da Sclerosi Multipla RR alla diagnosi e la loro correlazione con le caratteristiche cliniche delle ricadute di malattia e come predittore dell'evoluzione nel tempo della malattia.

Su un totale di 95 pazienti reclutati presso il Centro Sclerosi Multipla, 65 presentavano i criteri di inclusione nel presente studio. Pertanto abbiamo potuto misurare la concentrazione liquorale della proteina Gas6 in tutti i 65 pazienti considerati e la concentrazione sierica della stessa in 40 di essi. A tale proposito, abbiamo considerato solo i soggetti in cui la rachicentesi diagnostica fosse stata eseguita entro 90 giorni dall'esordio dei sintomi e comunque prima della risoluzione della sintomatologia riferibile al primo attacco e prima che fosse instaurata alcuna terapia specifica.

Per prima cosa abbiamo confrontato la concentrazione media liquorale della proteina Gas6 nei pazienti affetti da Sclerosi Multipla rispetto a quella dei pazienti di controllo affetti da patologie neurologiche non infiammatorie non autoimmuni (NINAD) reclutati per la prima parte dello studio. Abbiamo riscontrato che la concentrazione media liquorale di Gas6 è maggiore nei pazienti affetti da SM ($7,9 \pm 3,7$ ng/ml) rispetto a controlli NINAD ($6,5 \pm 2,4$ ng/ml) Test t di Student per campioni indipendenti, $p < 0,03$. Tuttavia tale differenza è risultata di poca entità ma soprattutto con valori di concentrazione di Gas6 molto dispersi (Figura 23).

Non vi era invece alcuna differenza statisticamente significativa tra la concentrazione sierica di Gas6 tra i pazienti con SM-RR (n°40) e con NINAD (n°26) ($p = n.s.$).

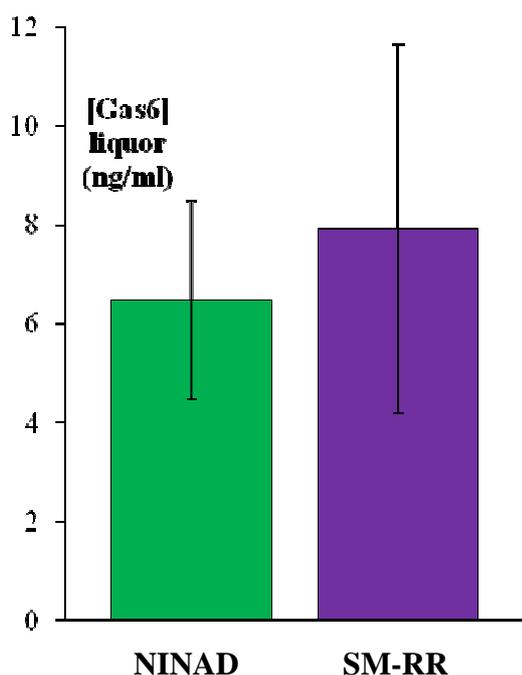


Figura 23: concentrazione media liquorale di Gas6 con rispettive deviazioni standard (barre di errore) nei pazienti con SM-RR e NINAD

Gas6 e caratteristiche cliniche delle recidive.

Abbiamo quindi correlato la concentrazione liquorale di Gas6 con i parametri di gravità della recidiva corrispondente (durata, severità, n° di sistemi funzionali coinvolti, sviluppo di sequele) e con alcuni parametri di evoluzione di malattia (frequenza annuale delle poussées e variazione annuale del punteggio EDSS).

La concentrazione liquorale media di Gas6 è risultata maggiore nelle poussées di più breve durata risultando di $8,7 \pm 3,9$ ng/ml nelle poussées con durata ≤ 60 giorni rispetto alle poussées con durata > 60 giorni ($6,5 \pm 2,6$ ng/ml) o ai controlli NINAD ($6,5 \pm 2,4$ ng/ml). Tale differenza è al limite della significatività statistica (ANOVA: $F=5,8$ $p<0,004$; test post-hoc Tukey, $p=0,055$). (Figura 24, A).

Inoltre la concentrazione liquorale media di Gas6 è risultata superiore nei pazienti che presentavano una poussée con al massimo 2 sistemi funzionali (FS) coinvolti ($8,5 \pm 3,8$ ng/ml) rispetto a quelli che presentavano una poussée con 3 o più sistemi funzionali coinvolti ($5,6 \pm 2,5$ ng/ml) o ai controlli NINAD. Anche in questo caso la differenza è risultata statisticamente significativa (ANOVA: $F=6,7$ $p<0,002$; test post-hoc Tukey, $p<0,05$). (Figura 24, B).

Abbiamo quindi valutato la concentrazione liquorale della proteina Gas6 in base alla gravità della poussée espressa come variazione del punteggio EDSS al nadir della poussée rispetto al valore precedente (in questo caso 0 essendo tutte prime poussées). Anche in questo caso la concentrazione media di Gas6 è risultata maggiore nei pazienti con una poussée con un punteggio EDSS $\leq 2,5$ ($8,8 \pm 3,7$ ng/ml) rispetto a quelli con punteggio ≥ 3 ($6,5 \pm 3,5$ ng/ml) o ai controlli. Tale differenza è statisticamente significativa (ANOVA: $F=6,6$ $p<0,002$; test post-hoc Tukey, $p<0,04$). (Figura 24, C).

Inoltre la concentrazione liquorale di Gas6 è risultata direttamente proporzionale al punteggio EDSS della poussée con una correlazione statisticamente significativa: concentrazione liquorale di Gas6 = $-1,5 * \text{punteggio EDSS} + 11,3$, $R^2=0,11$, $p<0,01$, (Figura 25, A). Va segnalato che la correlazione tra la concentrazione liquorale di Gas6 e il punteggio EDSS è risultata considerevolmente maggiore se venivano considerate solo la poussée con sintomi piramidali e cerebellari (concentrazione liquorale di Gas6 = $-2,5 * \text{punteggio EDSS} + 14,1$, $R^2=0,25$, $p<0,003$) (Figura 25, B) e ulteriormente maggiore considerando solo i sintomi cerebellari (concentrazione liquorale di Gas6 = $-2,4 * \text{punteggio EDSS} + 13,3$, $R^2=0,57$, $p<0,005$), (Figura 25, C).

La concentrazione liquorale media della proteina Gas6 non è invece risultata differente nei pazienti con sequele rispetto a quelli con recupero completo (ANOVA e test post-hoc Tukey, $7,6 \pm 3,5$ vs $8,2 \pm 4,0$ ng/ml vs controlli NINAD, $p=n.s.$).

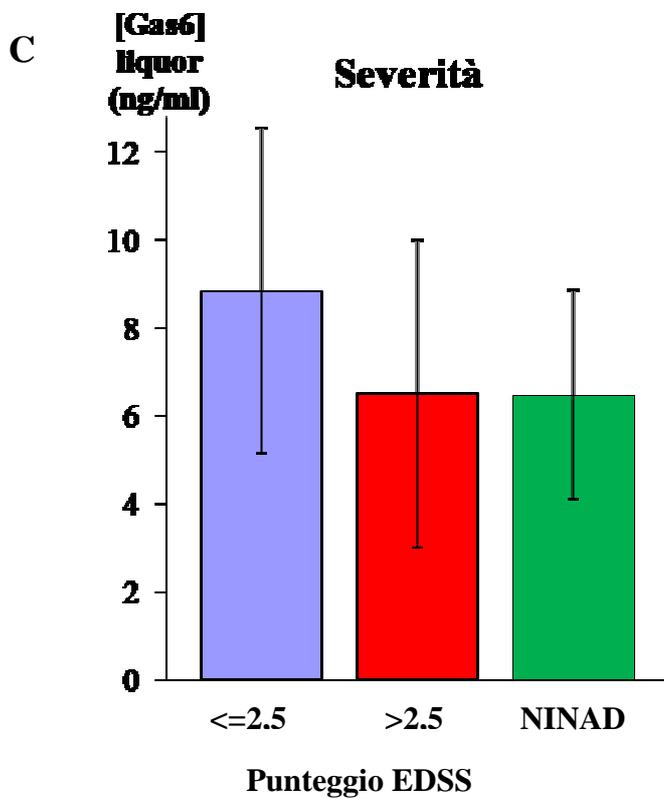
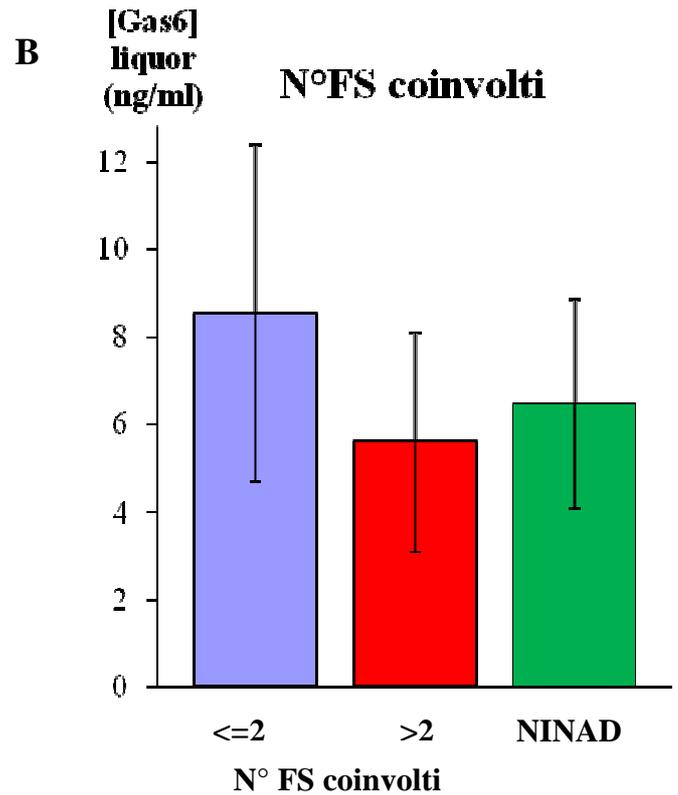
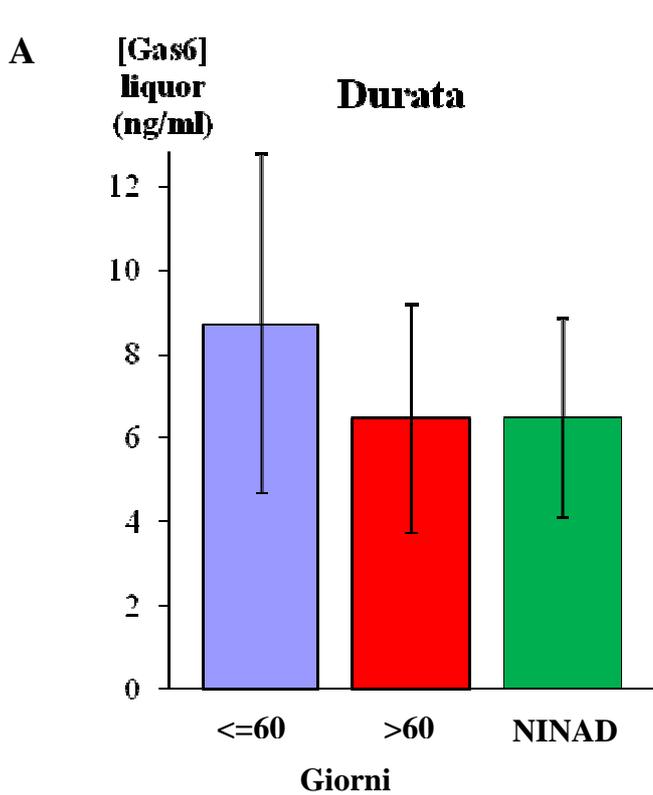


Figura 24. A. La concentrazione di Gas6 è maggiore se durata ≤60 giorni (8,7±3,9 ng/ml) vs durata >60 giorni (6,5±2,6 ng/ml) o controlli, p=0,055. B. La concentrazione media liquorale di Gas6 è maggiore se sono coinvolti ≤2 FS (8,5±3,8 ng/ml) vs >2 FS (5,6±2,5 ng/ml) o controlli, p<0,05. C. La concentrazione media liquorale di Gas6 è maggiore se severità ≤2,5 (8,8±3,7 ng/ml) vs severità ≥3 (6,5±3,5 ng/ml) o controlli, p<0,04. Tutte le analisi statistiche sono state condotte con test post-hoc di Tukey per campioni con numerosità diseguale.

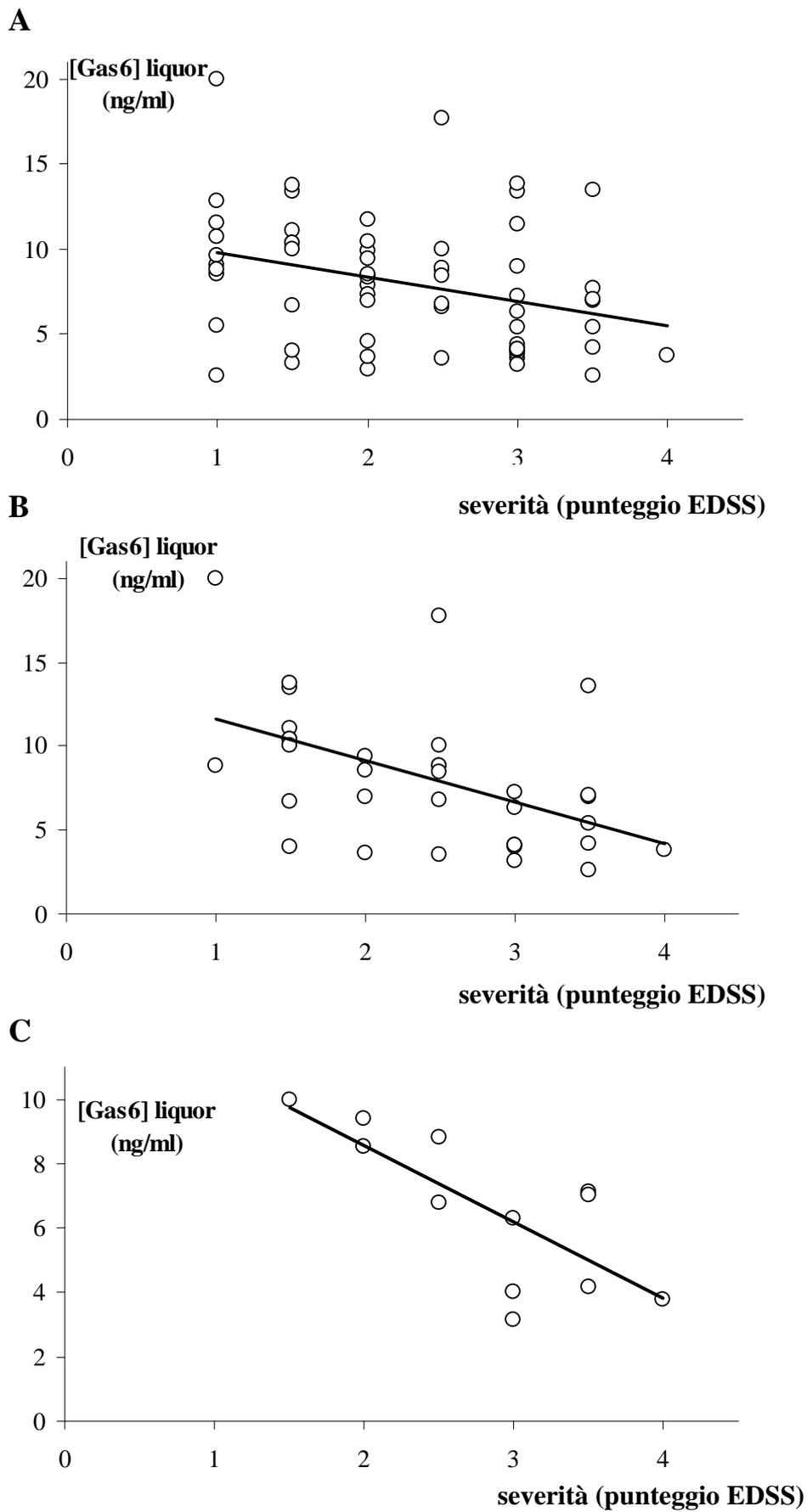


Figura 25, regressione lineare tra la concentrazione liquorale di Gas6 e la severità espressa in punteggio EDSS in tutti i pazienti (A), solo sintomi cerebellari e piramidali (B), solo cerebellari (C).

Abbiamo quindi valutato se anche la concentrazione sierica della proteina Gas6 fosse correlata alle caratteristiche cliniche della poussée.

La concentrazione sierica media di Gas6 non è risultata differente in correlazione con nessuna delle variabili sopra indicate applicando la medesima stratificazione per severità, durata, n°FS coinvolti e sequele utilizzata in precedenza (ANOVA, p=n.s.).

Va sottolineato inoltre che la concentrazione liquorale della proteina Gas6 non è risultata correlare affatto con la sua concentrazione sierica (concentrazione liquorale di Gas6 = $-0.007 * \text{concentrazione sierica di Gas6} + 7,1$, $R^2=0.0003$, p=n.s.) indicando come le variazioni di concentrazioni liquorali osservate nella SM derivino da variazioni primitive della concentrazione intratecale e non da variazioni della permeabilità della barriera ematoencefalica (Figura 26).

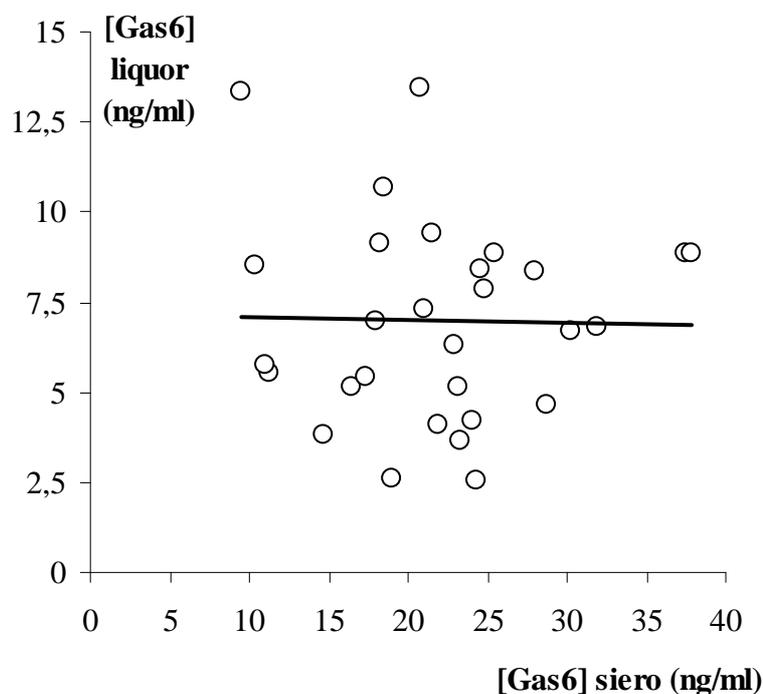


Figura 26, regressione lineare tra la concentrazione liquorale di Gas6 e la sua concentrazione sierica; si osserva una completa assenza di correlazione (vedi testo).

Gas6 e progressione di malattia.

Abbiamo quindi valutato la misurazione della concentrazione liquorale e sierica della proteina Gas6 in correlazione con parametri di evoluzione della sclerosi multipla nel tempo.

A tale proposito per 52 pazienti è stato possibile follow up minimo di 2,5 anni, medio di $5,9 \pm 1,8$ anni e mediano di 5,2 anni. I pazienti hanno presentato una media di $0,32 \pm 0,25$ e una mediana di 0,25 poussées/anno. Inoltre hanno presentato un progressione annualizzata del punteggio EDSS media di $1,6 \pm 1,0$ e mediana di 1,0.

Abbiamo confrontato la concentrazione della proteina Gas6 nei pazienti che hanno presentato una frequenza di poussées $\geq 0,25$ /anno rispetto ai pazienti con frequenza inferiore a 0,25. Non abbiamo osservato differenze significative nella concentrazione media di Gas6 in questi 2 gruppi sia nel liquor (test t di Student, $8,3 \pm 4,6$ vs $8,0 \pm 3,2$ ng/ml, $p=n.s.$) sia nel siero (test t di Student, $21,5 \pm 6,4$ vs $21,3 \pm 12,4$, $p=n.s.$).

Inoltre abbiamo valutato la concentrazione della proteina Gas6 nei pazienti con una progressione annuale dell'EDSS $\geq 0,2$ punti/anno rispetto a quelli con progressione inferiore a 0,2. Anche in questo caso sia la concentrazione liquorale (test t di Student, $7,9 \pm 2,9$ vs $8,0 \pm 4,9$, $p=n.s.$) sia la concentrazione sierica (test t di Student, $21,8 \pm 8,8$ vs $23,4 \pm 7,6$ ng/ml, $p=n.s.$) non sono risultate differenti confrontando i due gruppi di pazienti.

Infine né la concentrazione liquorale né quella sierica di Gas6 sono risultate correlare con la progressione annuale del punteggio EDSS né con la frequenza annuale di poussées (regressione lineare, $p=n.s.$).

DISCUSSIONE

Prima parte: valutazione del ruolo della proteina Gas6 nelle polineuropatie demielinizzanti del sistema nervoso periferico.

La proteina Gas6 è ligando di tre recettori tirosina chinasi (Axl, Tyro3 e Mer), coinvolta in diverse funzioni biologiche (Joseph DR, 1997; Godowski PJ et al., 1995; Varnum B et al., 1995; Manfioletti et al., 1993), agisce come un fattore di sopravvivenza per alcuni tipi di cellule, ed è coinvolto nella funzione piastrinica e nel controllo dell'angiogenesi (Gallicchio M et al., 1995; Angelillo-Scherrer et al., 2001). Gas6 ed i suoi recettori sono ampiamente espressi nel sistema nervoso di topi e ratti (Prieto AL et al., 1999; Prieto AL et al., 2000).

Abbiamo riscontrato che la proteina Gas6 è misurabile nel liquido cerebrospinale umano ad una concentrazione media di circa 6 ng/ml nei soggetti non affetti da malattie neurologiche infiammatorie o autoimmuni (NINAD) con minime variazioni tra le patologie. Questa è la prima segnalazione della misurazione della concentrazione della proteina Gas6 nel liquor umano. Dal momento che la sua concentrazione plasmatica media in soggetti sani di qualsiasi età è di circa 18 ng/ml, con minime variazioni (Alciato F et al., 2008; Balogh I et al., 2005) l'espressione liquorale è inaspettatamente elevata con un rapporto di 1:3 tra la concentrazione liquorale e quella nel plasma rispetto ad un rapporto di 1:50 - 1:200 per l'albumina, il cui peso molecolare è molto vicino a quello di Gas6. Poiché l'albumina liquorale deriva esclusivamente dai processi di ultrafiltrazione del plasma (Reiber H e Peter JB, 2001) suggeriamo che Gas6 venga trasportato attivamente nel liquido cerebrospinale o, più probabilmente, sintetizzato in sede intratecale. Inoltre, poiché l'interazione Gas6-recettori protegge diversi tipi di neuroni dall'apoptosi (Funakoshi H et al., 2002; Yagami T et al., 2002; Yagami T et al., 2003) e poiché Gas6 è un fattore di crescita/sopravvivenza per le cellule di Schwann e gli oligodendrociti in vitro (Shankar SL et al., 2003; Shankar SL et al., 2006; Li R et al., 1996) si può supporre che possa avere un significato fisiologico rilevante nel tessuto nervoso.

In secondo luogo, abbiamo osservato che la concentrazione liquorale di Gas6 è stabile nei pazienti con NINAD e raddoppia nei soggetti affetti da CIDP, ma non nella GBS, un'altra malattia infiammatoria-demielinizzanti autoimmune del sistema nervoso periferico. Abbiamo considerato come controllo (NINAD) alcune condizioni neurologiche in cui in cui l'infiammazione non fosse l'evento fisiopatologico prevalente.

L'elevazione della concentrazione liquorale di Gas6 nella CIDP è compatibile con l'idea che Gas6 possa essere coinvolto nella patogenesi delle malattie autoimmuni sistemiche croniche (Lemke G e

Lu Q, 2003). I topi KO privi dei recettori del Gas6, infatti, presentano diverse manifestazioni autoimmuni con espansione policlonale dei linfociti a causa di una continua iperattività macrofagica (Lu Q e Lemke G, 2001). Inoltre i recettori di Gas6 sono coinvolti nell'attivazione delle cellule dendritiche (Sen P et al., 2007). Infine un recente lavoro del nostro gruppo ha evidenziato come Gas6 inibisca la secrezione di Tnf-alpha, IL-6 e IL-1a da parte di macrofagi attivati da LPS (Alciato F et al., 2009). Tutte queste evidenze sperimentali sono a favore del fatto che Gas6 sia coinvolto nella regolazione dei monociti/macrofagi in nelle malattie autoimmuni croniche come molecola autocrina / paracrina di regolazione per i monociti (Lemke G e Lu Q, 2003).

La CIDP di per sé è una malattia cronica autoimmune, caratterizzata da una persistente infiltrazione di cellule mononucleate dei nervi periferici (Van Rhijn I et al., 2000). Inoltre, poiché i topi KO per la proteina costimolatoria inibitoria dei macrofagi B7-2 sviluppano una malattia molto simile, le cellule mononucleate sono evidentemente importanti nella patogenesi della CIDP (Salomone B et al., 2001 e Koller H et al., 2005). Tutti questi risultati sono a favore dell'ipotesi l'elevazione della concentrazione liquorale di Gas6 nella CIDP potrebbe essere un fattore correlabile al tentativo di controllo dell'aggressione cronica infiammatoria dei nervi periferici.

L'assenza di un significativo aumento della concentrazione di Gas6 nel liquor dei pazienti affetti da GBS può essere determinato dalla differenza nel decorso della malattia rispetto alla CIDP. La GBS ha un esordio acuto e un'evoluzione di solito autolimitante, ovviamente la cui fase iniziale è l'attivazione dell'immunità umorale contro le cellule di Schwann (Hughes RA e Cornblath DR, 2005; Hafer-Macko CE et al 1996). Il ruolo prevalente dell'immunità umorale è anche dimostrato dal fatto che i trattamenti destinati a inibire la produzione di anticorpi, come la plasmateresi o le immunoglobuline, sono molto efficaci (Hughes RA e Cornblath DR, 2005). A tale proposito si potrebbe speculare che Gas6 sia coinvolta nei meccanismi di controllo dell'immunità cellulo-mediata, ma non nei meccanismi dell'autoimmunità umorale anche se è evidente che l'infiltrazione dei macrofagi nei nervi periferici è un elemento caratteristico sia della CIDP sia della GBS (Said G, 2006; Hughes RA e Cornblath DR, 2005); Tuttavia la GBS è una malattia acuta in cui l'aggressione ai nervi delle cellule mononucleate è acuta e transitoria, mentre è cronica e persistente nella CIDP.

Questa ipotesi del fatto che Gas6 sia correlata con la persistenza di un processo infiammatorio cronico sostenuto da cellule mononucleate è tuttavia in contrasto con tutte le evidenze sperimentali attualmente disponibili, essendo la proteina Gas6 sempre correlata con la limitazione della funzione macrofagica e non viceversa (Lemke G e Lu Q, 2003; Sen et al., 2006; Alciato F et al., 2009). Pertanto l'elevazione della concentrazione della proteina Gas6 nei pazienti con CIDP non è giustificabile in modo soddisfacente, con i dati al momento a disposizione, con un coinvolgimento diretto nella regolazione dell'aggressione autoimmune. Potrebbe essere, nella CIDP, un

meccanismo, parzialmente efficace di contro regolazione ma tale ipotesi è puramente speculativa e necessita di ulteriori valutazioni.

Un'altra ipotesi sul ruolo dell'elevazione della concentrazione liquorale di Gas6 nelle CIDP viene da un suo potenziale coinvolgimento nei processi riparativi del danno alla mielina. Poiché Gas6 è un fattore antiapoptotico per i neuroni e per le cellule gliali coinvolti nella mielinizzazione e, in particolare, è sia fattore di crescita sia antiapoptotico per le cellule di Schwann (Funakoshi H et al., 2002; Yagami T et al., 2002; Yagami T et al., 2003; Shankar SL et al., 2003; Shankar SL et al., 2006; Li R et al., 1996) il suo aumento nelle CIDP potrebbe essere interpretato come un meccanismo di compensazione per contrastare demielinizzazione, da un lato favorendo la sopravvivenza di cellule di Schwann danneggiate dall'infiammazione limitandone l'apoptosi e quindi l'ulteriore estensione del danno, dall'altro guidando la remielinizzazione in modo autocrino / paracrino.

Tuttavia se la precedente ipotesi è vera, ovvero che Gas6 interviene nel favorire la sopravvivenza delle cellule di Schwann e ne favorisce la riparazione del danno, allora ci si dovrebbe aspettare una elevazione anche nella GBS. Tuttavia anche qui la differenza di evoluzione di malattia potrebbe giustificare la differenza, infatti, studi animali di lesione delle radici nervose midollari hanno evidenziato che le cellule di Schwann iniziano a proliferare e iniziano a remielinizzare le fibre nervose solo a partire da 3 settimane dopo il danno (Said G e Hontebeyrie-Joskowicz M, 1992; Said G, 2006). Dal momento che la puntura lombare è di solito effettuata al momento della diagnosi, e quindi generalmente ben prima di 3 settimane dall'esordio dei sintomi, la remielinizzazione potrebbe non essere ancora iniziata in modo significativo e quindi l'aumento della concentrazione di CSF Gas6 potrebbe ancora non essere evidente. Solo la valutazione del liquor di questi pazienti durante la fase di recupero consentirebbe di valutare tale ipotesi.

L'ipotesi che Gas6 sia elevato nelle CIDP come meccanismo di contro regolazione atto a favorire la sopravvivenza delle cellule di Schwann e la remielinizzazione delle fibre danneggiate ci pare la più verosimile anche sulla base delle considerazioni che si possono trarre dalla seconda parte del nostro studio che verranno discusse successivamente. Torneremo pertanto su tale interpretazione, che ci pare la più ragionevole, ancora nella discussione della seconda parte di questo studio.

Abbiamo inoltre cercato di valutare se la concentrazione liquorale di Gas6 fosse influenzata da variabili di confondimento. Infatti la concentrazione di proteine liquorali è nota aumentare con l'età (Deisenhammer F et al., 2006) inoltre sia nella CIDP sia nella GBS si osserva un'alterazione della barriera emato-encefalica e un conseguente massiccio aumento della concentrazione di proteine liquorali (Reiber H e Peter JB, 2001). Nel nostro studio abbiamo evidenziato che la concentrazione

liquorale di Gas6 non era significativamente correlata all'età nei pazienti con NINAD e possiamo quindi affermare che la concentrazione liquorale di Gas6 non è verosimilmente influenzata da un deterioramento età-dipendente della barriera emato-encefalica. Inoltre è inverosimile che l'alterazione della barriera ematoencefalica possa giustificare l'aumento della concentrazione liquorale di Gas6 nelle CIDP, infatti abbiamo osservato concentrazioni liquorali di proteine totali e alterazione del rapporto proteine liquorali/proteine sieriche sostanzialmente identiche nei pazienti con CIDP e GBS in ambedue i casi elevate rispetto ai controlli. Pertanto l'elevazione della concentrazione di Gas6 nelle CIDP e non nella GBS non può essere determinato dall'alterazione della permeabilità della barriera ematoencefalica.

In conclusione, in questa prima parte del nostro studio rivolta a valutare un ruolo della proteina Gas6 nelle polineuropatie demielinizzanti autoimmuni, abbiamo dimostrato che la proteina Gas6 è rilevabile nel liquor cerebrospinale umano. L'elevato rapporto tra la concentrazione liquorale e plasmatica suggerisce che possa essere prodotta in sede intratecale e possa agire come un fattore di crescita del tessuto nervoso. Il fatto che la sua concentrazione liquorale è elevata nei pazienti con CIDP può fare ipotizzare un suo coinvolgimento nella demielinizzazione infiammatoria cronica o, più probabilmente, come fattore di sopravvivenza per le cellule di Schwann e promotore di remielinizzazione. Ulteriori studi sono necessari per valutare l'utilità del dosaggio del Gas6 nella diagnosi di CIDP e il suo ruolo nella patogenesi di tale malattia.

Seconda parte: valutazione del ruolo della proteina Gas6 nei pazienti con Sclerosi Multipla

Il razionale per questa valutazione ci è fornito da numerose evidenze in letteratura condivise con le evidenze che hanno portato a condurre lo studio riguardo il ruolo di Gas6 nelle polineuropatie demielinizzanti autoimmuni già ampiamente descritte in precedenza. In breve diversi studi hanno dimostrato la presenza di Gas6 e dei suoi recettori nel sistema nervoso centrale e periferico. A tale proteina è stato riconosciuto sia un ruolo neurotrofico e proliferativo sia antiapoptotico nei confronti di oligodendrociti, cellule di Schwann e in svariate popolazioni neuronali (neuroni dell'ippocampo, neuroni GnRh dell'ipotalamo, neuroni corticali cerebrali e cerebellari). Infine l'espressione del mRNA di Gas6 e dei suoi recettori interessa diffusamente la corteccia cerebrale, cerebellare e dell'ippocampo nei ratti e nei topi sia durante lo sviluppo embrionale sia nell'età adulta con possibili importanti implicazioni nella sopravvivenza di queste popolazioni cellulari soprattutto durante lo sviluppo embrionale. Pertanto il sistema Gas6/recettori tirosin kinasi sembrerebbe essere importante nel controllo della sopravvivenza dei seguenti tipi cellulari neuronali e gliali: oligodendrociti, cellule di Schwann, neuroni dell'ippocampo, neuroni GnRh dell'ipotalamo, neuroni corticali cerebrali e cerebellari. (Allen MP et al., 1999; Allen MP et al., 2002; Funakoshi H et al., 2002; Li R et al., 1996; Prieto AL et al., 1999; Prieto et al., 2000; Shankar SL et al., 2003; Shankar SL et al., 2006; Yagami T et al., 2002; Yagami T et al., 2003).

Più nel dettaglio, recentissimi studi hanno fornito ulteriori basi razionali per correlare le funzioni proteina Gas6 con la patogenesi della sclerosi multipla. Infatti i topi *gas6* ^{-/-} presentano, rispetto ai controlli wild type, una maggiore estensione del danno da demielinizzazione con un maggior numero di oligodendrociti in apoptosi, un maggiore e più esteso infiltrato di macrofagi e cellule della microglia con conseguente aggravamento del danno mielinico (Binder MD et al., 2008; Binder MD e Kilpatrick TJ, 2009). Inoltre studi istopatologici hanno evidenziato come nelle placche croniche di SM nell'uomo si osservi uno squilibrio tra espressione di Gas6 di poco aumentata e enorme aumento dei suoi recettori solubili (sAxl e sMer) con conseguente perdita del corretto signaling Gas6-recettori con possibili funzioni deleterie nel favorire la cronicizzazione del danno mielinico cronico tipico della SM (Weinger JG et al., 2009).

Nel nostro studio abbiamo evidenziato come la concentrazione liquorale, ma non quella sierica, della proteina Gas6 fosse maggiore nei pazienti con SM alla diagnosi rispetto ai controlli affetti da NINAD. Tuttavia tale differenza è modesta e soprattutto abbiamo osservato una notevole dispersione dei valori di concentrazione di Gas6, dato piuttosto strano, in quanto la concentrazione liquorale di Gas6 è risultata in vari studi preliminari e nell'analisi descritta nella prima fase del nostro studio molto stabile e con poca variazione all'interno di gruppi di diagnosi omogenei.

Pertanto la dispersione dei valori nei pazienti con SM ci ha indotto a valutare se ci fosse una relazione tra la concentrazione della proteina Gas6 con alcune caratteristiche cliniche di malattia e non con la malattia in se stessa.

A tale proposito, abbiamo evidenziato che la concentrazione liquorale della proteina Gas6 misurata durante il primo attacco di SM, correla con parametri clinici di gravità della poussée. Infatti la concentrazione liquorale di Gas6 è risultata maggiore nelle ricadute di malattia di durata più breve, con meno sistemi funzionali coinvolti e soprattutto nelle poussées con una minore severità misurata come variazione del punteggio EDSS.

A tale proposito Gas6 parrebbe presentare un ruolo protettivo nel limitare il danno da demielinizzazione infiammatoria. Infatti già si è abbondantemente discusso del fatto che vi siano numerose evidenze in letteratura che individuano per Gas6 un ruolo di inibitore della attivazione dei macrofagi e di fattore di sopravvivenza dei neuroni e soprattutto degli oligodendrociti (Lemke G e Lu Q, 2003; Sen et al., 2006; Alciato F et al., 2009; Funakoshi et al., 2002; Li., et al 1996; Shankar et al., 2003; Allen et al., 1999; Allen et al., 2002), inoltre i topi knock out per Gas6 hanno effettivamente un danno da demielinizzazione più esteso con un maggiore infiltrato di macrofagi e cellule microgliali e un maggior numero di oligodendrociti in apoptosi (Binder et al, 2008). Il nostro risultato si inserisce perfettamente in questo contesto in modo molto semplice: i pazienti che hanno una recidiva di SM più lieve, più breve e con meno sintomi sono quelli che hanno una elevazione liquorale di Gas6 significativa. In altre parole i soggetti che hanno una risposta liquorale di Gas6 significativa presentano una minore estensione del danno da demielinizzazione infiammatoria. Sempre sulla base degli elementi sopra esposti, potremmo ipotizzare che i pazienti con un mancato aumento liquorale della concentrazione di Gas6 e quindi, di converso, con una poussée più grave, potrebbero avere un difetto di espressione o di produzione di Gas6 con conseguente inadeguata risposta durante un evento demielinizzante acuto. Tale ipotesi è ulteriormente in accordo con alcuni dati sperimentali ottenuti negli animali da esperimento dove il danno demielinizzante indotto da cuprizone risultava maggiore negli animali con una delezione del gene Gas6 (Binder et al, 2008).

Non abbiamo naturalmente elementi più precisi per valutare se Gas6 sia un fattore determinante a tale proposito o se sia semplicemente indice di una migliore risposta complessiva dei sistemi di riparazione e contenimento del danno infiammatorio demielinizzante. Stiamo conducendo studi su animali da esperimento inducendo l'encefalite sperimentale autoimmune per approfondire i meccanismi sottesi al ruolo della proteina Gas6 nella demielinizzazione infiammatoria.

È certo che tutte le informazioni presenti in letteratura, insieme con i nostri risultati, portano nella medesima direzione di un ruolo diretto di Gas6 nella regolazione della risposta alla demielinizzazione infiammatoria. Infatti Gas6 interviene nel proteggere gli oligodendrociti

dall'apoptosi, permettendo così che se ci sono più oligodendrociti che sopravvivono al danno, migliore e più rapida sarà la riparazione dello stesso. D'altra parte Gas6 agirebbe di concerto nel ridurre l'infiltrazione microgliale e contemporaneamente la secrezione di citochine pro infiammatorie quali Il-1beta, Tnf-alpha e IL-6 da parte dei medesimi tipi cellulari nelle medesime condizioni (Sen P et al., 2006, Lemke G e Lu Q, 2003, Alciato F et al, 2009) e di conseguenza riducendo l'estensione e il mantenimento del danno sulla mielina. Inoltre Gas6 favorisce la clearance dei corpi apoptotici tramite il suo recettore Mer da parte dei macrofagi, delle cellule dendritiche e delle cellule della microglia (Shao WH et al., 2009; Grommes C et al., 2008, Lemke G e Lu Q, 2003, Sen P et al., 2006). Pertanto in assenza di Gas6 sembra verificarsi il circuito a feedback negativo tipico delle reazioni infiammatorie autoimmuni: maggiore apoptosi, maggiore infiltrazione delle cellule fagocitiche secernenti citochine pro infiammatorie con capacità di clearance delle cellule apoptotiche ridotte e conseguente perpetrazione dell'aggressione infiammatoria. Infatti se la presenza di corpi apoptotici non adeguatamente clearati favorisce l'esposizione di auto antigeni alle cellule fagocitiche che non essendo inibite presentano tali antigeni alle cellule T CD4+ e producono citochine pro infiammatorie e se l'interazione Gas6-Mer e Gas6-Axl favorisce la clearance dei corpi apoptotici e la inibizione delle cellule fagocitiche pare evidente che la disregolazione del sistema Gas6-recettori possa essere un punto potenzialmente importante nella genesi dell'autoimmunità e potenzialmente contribuire alla patogenesi della Sclerosi Multipla.

Di conseguenza il fatto che i pazienti con poussée più gravi non abbiano una adeguata secrezione liquorale di Gas6 potrebbe essere interpretabile come soggetti con un sistema Gas6/recettori "difettoso" e di conseguenza potenzialmente predisposti a sviluppare autoimmunità. Tale interpretazione affascinante necessita ovviamente di ulteriori approfondimenti di ricerca.

Un dato di sicuro interesse è il riscontro di una migliore correlazione dei valori di concentrazione di Gas6 con la gravità di alcuni tipi di poussée ovvero quelle motorie e cerebellari rispetto ad altri sistemi funzionali (per es. sensitivi). Tale dato potrebbe essere semplicemente legato ad un difetto intrinseco nella quantificazione della gravità dei sintomi con la scala EDSS ed al fatto che lo scoring FS per questi 2 sintomi si correli maggiormente all'entità o all'estensione del danno infiammatorio demielinizzante.

Certamente un limite del nostro studio è la mancanza di una misurazione diretta per quantificare il danno demielinizzante nei pazienti. Stiamo rivalutando le immagini RMN corrispondenti alla diagnosi per valutare se effettivamente un valore liquorale maggiore di Gas6 si correla effettivamente con una estensione del danno infiammatorio in RMN minore.

Va inoltre ricordato che la concentrazione liquorale di Gas6 non è risultata differente nei soggetti con recupero incompleto dopo la poussée (sequele) rispetto a quelli con recupero completo. Ciò contrasterebbe con un ruolo decisivo di Gas6 nei processi di riparazione del danno da demielinizzazione mentre rafforzerebbe la correlazione, espressa sopra, di Gas6 con l'evento demielinizzante acuto come fattore coinvolto nel limitare l'estensione e l'entità del danno demielinizzante infiammatorio.

Dato di ulteriore grande interesse è il fatto che la concentrazione liquorale di Gas6 e quella sierica non correlino affatto durante una poussées di SM. Ovvero la variazione liquorale di Gas6 non è affatto influenzata da una sua variazione sierica e di conseguenza dalla permeabilità della barriera ematoencefalica. Parrebbe invece che a variare sia soltanto il Gas6 contenuto nel sistema nervoso centrale e che, di conseguenza, le variazioni misurate derivino da una variazione di espressione "locale".

Infine la concentrazione di Gas6 alla prima poussée non è risultata predire l'andamento clinico della SM negli anni successivi di follow up. Tale dato va sicuramente interpretato con cautela in quanto il numero di pazienti seguiti è limitato e soprattutto pochi pazienti hanno avuto una frequenza di poussée/anno o un peggioramento EDSS significativo. Numeri maggiori sono necessari a confutare completamente tale ipotesi. D'altra parte il sistema Gas6/recettori potrebbe essere legato prevalentemente o esclusivamente alle fasi iniziali dell'evento demielinizzante o alle recidive in se e non correlarsi invece ad una predisposizione alla ricorrenza di tali eventi. Naturalmente anche queste ipotesi sono esclusivamente speculative e meritevoli di rivalutazione.

In conclusione nella seconda fase del nostro studio abbiamo identificato che una aumentata concentrazione liquorale della proteina Gas6 si correla con una minore gravità della poussée di Sclerosi Multipla. La sua variazione di concentrazione è esclusivamente liquorale e non sierica e potrebbe essere la conseguenza di un sistema di limitazione del danno da demielinizzazione infiammatoria favorendo la sopravvivenza degli oligodendrociti in sofferenza e limitando l'aggressione delle cellule microgliali e monocitarie. Infine il mancato aumento della sua concentrazione liquorale nelle poussée più gravi potrebbe essere espressione di un sistema Gas6/recettori inefficiente nella protezione dal danno demielinizzante infiammatorio autoimmune, e quindi fattore favorente un fenotipo di malattia più aggressivo.

BIBLIOGRAFIA

AAN. Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP): report from an ad hoc subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force. *Neurology* 1991;41:617-8.

Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:464-78.

Alciato F, Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Carnieletto S, Avanzi GC. Development and validation of an ELISA method for detection of growth arrest specific 6 (GAS6) protein in human plasma. *J Immunoassay Immunochem.* 2008;29:167-80.

Alciato F, Sainaghi PP, Sola D, Castello L, Avanzi GC. GAS6 modulates cytokines secretion in U-937 (Human monocyte-like cell line) with an anti-inflammatory effect. *J Leuk Biol* 2009; Accepted with revision.

Allen MP, Linseman DA, Udo H, Xu M, Schaack JB, Varnum B, Kandel ER, Heidenreich KA, Wierman ME. Novel mechanism for gonadotropin-releasing hormone neuronal migration involving Gas6/Ark signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 2002;22:599-613.

Allen MP, Zeng C, Schneider K, Xiong X, Meintzer MK, Bellosta P, Basilico C, Varnum B, Heidenreich KA, Wierman ME. Growth arrest-specific gene 6 (Gas6)/adhesion related kinase (Ark) signaling promotes gonadotropin-releasing hormone neuronal survival via extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt. *Mol Endocrinol* 1999;13: 191-201.

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. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protect mice against thrombosis. *Nature Medicine* 2001;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. Role of Gas6 receptors in platelet signalling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest* 2005;13:1-10.

Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005;97:512-23.

Asbury AK, Cornblath DR. Assessment of current diagnostic criteria for Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol* 1990;27 Suppl:S21-4.

Avanzi GC, Gallicchio M, Bottarel F, Gammaitoni L, Cavalloni G, Buonfiglio D, Bragardo M, Bellomo G, Albano E, Fantozzi R, Garbarino G, Varnum B, Aglietta M, Saglio G, Dianzani U, Dianzani C. GAS6 inhibits granulocyte adhesion to endothelial cells. *Blood* 1998; 91:2334-40

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

Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlback B. Analysis of Gas6 in human platelets and plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1280-6.

- Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:4123-31.
- Bellosta P, Costa M, Lin DA, Basilico C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol Cell Biol* 1995;15:614-25.
- Bellosta P, Zhang Q, Goff SP, Basilico C. Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. *Oncogene* 1997;15:2387-2397.
- Bergers G, Hanahan D. Models of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:592603.
- Binder MD, Cate HS, Prieto AL, Kemper D, Butzkueven H, Gresle MM, Cipriani T, Jokubaitis VG, Carmeliet P, Kilpatrick TJ. Gas6 deficiency increases oligodendrocyte loss and microglial activation in response to cuprizone-induced demyelination. *J Neurosci*. 2008;28:5195-206.
- Binder MD, Kilpatrick TJ. TAM receptor signalling and demyelination. *Neurosignals* 2009;17:277-87.
- Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Oberhuber G. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res* 2000;60:4693-6
- Borgel D, Clauser S, Bornstain C, Bieche I, Bissery A, Remones V, Fagon JY, Aiach M, Diehl JL. Elevated growth-arrest-specific protein 6 plasma levels in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 2006;34:219-222.
- Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol* 1995;130:503-6
- Brooks PC, Stromblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA. Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 1995;96:1815-22
- Brooks PC. Cell adhesion molecules in angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 1996;15:187-9
- Burgos H. Angiogenic and growth factors in human amnio-chorion and placenta. *Eur J Clin Invest* 1983;13:289-96
- Camenisch TD, Koller BH, Earp HS, Matsushima GK. A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF-alpha production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Immunol* 1999;162:3498-3503.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95.
- Cébe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, Manlius C, Wood J, Ballmer-Hofer K. A VEGF-A splice variant defective for heparan sulphate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:2067-77.

- Chen J, Carey K, Godowsky PJ. Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* 1997; 14:2033-9.
- Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Jennette JC, Roubey RA, Earp HS, Matsushima G, Reap EA. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J Exp Med* 2002;196:135-40.
- Collett G, Wood A, Alexander MY, Varnum BC, Boot-Handford RP, Ohanian V, Ohanian J, Fridell YW, Canfield AE. Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. *Circ Res* 2003;92:1123-9.
- Conrotto P, Valdembrì D, Corso S, Serini G, Tamagnone L, Comoglio PM, Bussolino F, Giordano S. Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by plexin B1. *Blood* 2005;105:4321-8.
- Conti CJ. Vascular Endothelial Growth Factor: regulation in the mouse skin carcinogenesis model and use in antiangiogenesis cancer therapy. *Oncologist* 2002;7:4-11.
- Craven RJ, Xu LH, Weiner TM, Fridell YW, Dent GA, Srivastava S, Varnum B, Liu ET, Cance WG. Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *Int J Cancer* 1995;60:791-7.
- Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:201-7.
- Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest.* 1999;103:157-8.
- Davis GE, Bayless KJ. An integrin and Rho GTPase-dependent pinocytotic vacuole mechanism controls capillary lumen formation in collagen and fibrin matrices. *Microcirculation* 2003;10,27-44.
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD. Isolation of Angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87:1161-9.
- D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, Vollrath D. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet* 2000;9:645-651.
- Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, et al. EFNS Task Force. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *Eur J Neurol* 2006;13:913-22.
- Dell'Era P, Belleri M, Stabile H, Massardi ML, Ribatti D, Presta M. Paracrine and autocrine effects of fibroblast growth factor-4 in endothelial cells. *Oncogene* 2001;20:2655-63.
- Dong X, Han ZC, Yang R. Angiogenesis and antiangiogenic therapy in hematologic malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;62:105-18.
- Dvorak HF, Harvey VS, Estrella P, Brown LF, McDonagh J, Dvorak AM. Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest* 1987;57:673-86.

- Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* 2008;8:579-91.
- Evans DM, Sloan-Stackleff KD. Role of urokinase PAIs in the control of cancer invasion and metastasis. *DNP* 1997;10:85-8
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2002;9:669-76.
- Fiebeler A, Park JK, Muller DN, Lindschau C, Mengel M, Merkel S, Banas B, Luft FC, Haller H. Growth arrest specific protein 6/Axl signaling in human inflammatory renal diseases. *Am J Kidney Dis* 2004;43:286-95.
- Folkman J, Klagsburn M. Angiogenic factors. *Science* 1987;235:442-7.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
- Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995;333:1757-63.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995;376:66-70.
- Foster RR, Saleem MA, Mathieson PW, Bates DO, Harper SJ. Vascular endothelial growth factor and nephrin interact and reduce apoptosis in human podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F48-57.
- Fridell YWC, Villa J, Attars Jr EC, Liu ET. GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998;273:7123-6.
- Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 1995;270:1500-2.
- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* 1998;94:715-25.
- Fulgham DL, Widhalm SR, Martin S, Coffin JD. FGF-2 dependent angiogenesis is a latent phenotype in basic fibroblast growth factor transgenic mice. *Endothelium* 1999; 6:185-95.
- Funakoshi H, Yonemasu T, Nakano T, Matumoto K, Nakamura T. Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 2002;68:150-60.
- Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Vollrath D. Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 2000;26:270-1.
- Galicchio M, Mitola S, Valdembrì D, Fantozzi D, Varnum B, Avanzi GC, Bussolino F. Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 - mediated endothelial cell activation by Axl Tyrosine Kinase Receptor1. *Blood* 2005;105:1970-6.
- Gasparini G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs* 1999;58:17-38.

- Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003;314:15-23.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003 23;161:1163-77.
- Godowsky PJ, Mark MR, Chen J, Sadick MD, Raab H, Hammonds RG. Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro3. *Cell* 1995;82:355-8
- Goetzl EJ, Banda MJ, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 1996;156:1-4.
- Gold R, Archelos JJ, Hartung HP. Mechanisms of immune regulation in the peripheral nervous system. *Brain Pathol* 1999;9:343-60.
- Goruppi S, Ruaro E, Schneider C. Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 1996;12:471-80.
- Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, Snodgrass HR, Earp HS. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ* 1994;5:1022.
- Griffin JW, Li CY, Ho TW, Tian M, Gao CY, Xue P, Mishu B, Cornblath DR, Macko C, McKhann GM, Asbury AK. Pathology of the motor-sensory axonal Guillain-Barré syndrome. *Ann Neurol*. 1996;39:17-28.
- Grommes C, Lee CY, Wilkinson BL, Jiang Q, Koenigsknecht-Talboo JL, Varnum B, Landreth GE. Regulation of microglial phagocytosis and inflammatory gene expression by Gas6 acting on the Axl/Mer family of tyrosine kinases. *J Neuroimmune Pharmacol* 2008;3:130-40.
- Gualandris A, Rusnati M, Belleri M, Nelli EE, Bastaki M, Molinari-Tosatti MP, Bonardi F, Parolini S, Albin A, Morbidelli L, Ziche M, Corallini A, Possati L, Vacca A, Ribatti D, Presta M. Basic fibroblast growth factor overexpression in endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases. *Cell Growth Differ* 1996;7:147-60.
- Guo DQ, Wu LW, Dunbar JD, Ozes ON, Mayo LD, Kessler KM, Gustin JA, Baerwald MR, Jaffe EA, Warren RS, Donner DB. Tumor necrosis factor employs a protein tyrosine phosphatase to inhibit activation of KDR and vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 2000;275:11216-21.
- Hafer-Macko CE, Sheikh KA, Li CY, Ho TW, Cornblath DR, McKhann GM, Asbury AK, Griffin JW. Immune attack on the Schwann cell surface in acute inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Ann Neurol* 1996;39:625-35.
- Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, O'Connor KC, De Jager P, Baecher-Allan C. Multiple sclerosis. *Immunol Rev* 2005;204:208-31.
- Hafler DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2004;113:788-94.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86:353-64.

- Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* 2008;8:880-7.
- Hellström M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, Alva J, Nilsson AK, Karlsson L, Gaiano N, Yoon K, Rossant J, Iruela-Arispe ML, Kalén M, Gerhardt H, Betsholtz C. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 2007;445:776-80.
- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011-27.
- Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 1999;18:5356-62.
- Hughes R, Bensa S, Willison H, et al. Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Neurol* 2001;50: 195-201.
- Hughes RC, Cornblath D. Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 2005;366:1653-1666.
- Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11–25.
- Ishikawa M, Kawase I, Ishii F. Combination of amino acids reduces pigmentation in B16F0 melanoma cells. *Biol Pharm Bull.* 2007;30:677-81.
- Ito T, Ito M, Naito S, Ohtsuru A, Nagayama Y, Kanematsu T, Yamashita S, Sekine I. Expression of the Axl receptor tyrosine kinase in human thyroid carcinoma. *Thyroid* 1999;9:563-7.
- Jacobs BC, Rothbarth PH, van der Meché FG, Herbrink P, Schmitz PI, de Klerk MA, van Doorn PA. The spectrum of antecedent infections in Guillain Barré syndrome. A case-control study. *Neurology* 1998;51:1110–1115.
- Janssen JW, Schulz AS, Steenvoorden AC, Schmidberger M, Strehl S, Ambros PF, Bartram CR. A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene* 1991;6:2113-20.
- Javerzat S, Auguste P, Bikfalvi A. The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med* 2002;8:483-9
- Joseph DR. Sequence and functional relationships between androgen-binding protein/sex hormone binding globulin and its homologs protein S, Gas6, laminin, and agrin. *Steroids* 1997;62:578-88.
- Jubb AM, Oates AJ, Holden S, Koeppen H. Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nat Rev Cancer* 2006;6:626-35.
- Kamei M, Saunders WB, Bayless KJ, Dye L, Davis GE, Weinstein BM. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* 2006;442:453-6.
- Kanda T, Numata Y, Mizusawa H. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75:765-9.

- Kastenbauer S, Koedel U, Wick M, Kieseier BC, Hartung HP, Pfister HW. CSF and serum levels of soluble fractalkine (CX3CL1) in inflammatory diseases of the nervous system. *J Neuroimmunol* 2003;137:210-7.
- Katz JS, Barohn RJ, Kojan S, et al. Axonal multifocal motor neuropathy without conduction block or other features of demyelination. *Neurology* 2002;58:615-20.
- Kerbel RS. Tumor Angiogenesis. *N Engl J Med* 2008;358:2039-49.
- Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP. The role of macrophages in immunemediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 2001;64:109-27.
- Kieseier BC, Krivacic K, Jung S, Pischel H, Toyka KV, Ransohoff RM, Hartung HP. Sequential expression of chemokines in experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol* 2000;110:121-129.
- Kieseier BC, Tani M, Mahad D, Oka N, Ho T, Woodroffe N, Griffin JW, Toyka KV, Ransohoff RM, Hartung HP. Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: a central role for IP-10. *Brain* 2002;125:823-34.
- Klein S, Giancotti FG, Presta M, Albeda SM, Buck CA, Rifkin DB. Basic fibroblast growth factor increases expression in microvascular endothelial cells. *Mol Biol Cell* 1993;4:973-82.
- Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature* 1995;376:517-9.
- Köller H, Kieseier BC, Jander S, Hartung HP. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *N Engl J Med* 2005;352:1343-56.
- Koller H, Schroeter M, Kieseier BC, Hartung HP. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy--update on pathogenesis, diagnostic criteria and therapy. *Curr Opin Neurol* 2005;18:273-8.
- Kwa MS, van Schaik IN, De Jonge RR, Brand A, Kalaydjieva L, van Belzen N, Vermeulen M, Baas F. Autoimmunoreactivity to Schwann cells in patients with inflammatory neuropathies. *Brain* 2003;126:361-75.
- Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. *Nat Genet* 2003;34:383-94.
- Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, Avraham S. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med* 2007;4:e186.
- Lemke G, Lu Q. Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors. *Curr Opin Immunol* 2003;15:31-6.

- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9.
- Ley CD, Olsen MW, Lund EL, Kristjansen PE. Angiogenic synergy of bFGF and VEGF is antagonized by Angiopoietin-2 in a modified in vivo Matrigel assay. *Microvasc Res* 2004;68:161-8.
- Li R, Chen J, Hammonds G, Phillips H, Armanini M, Wood P, Bunge R, Godowski PJ, Sliwkowski MX, Mather JP. Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *J Neurosci* 1996;16:2012-9.
- Lichtenbeld HHC, van Dam-Mieras MCE, Hillen HFP. Tumor angiogenesis: pathophysiology and clinical significance. *Neth J Med* 1996;49:42-51.
- Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001;61:253-70.
- Liu C, Blumhardt LD. Assessing relapses in treatment trials of relapsing and remitting multiple sclerosis: can we do better? *Multiple sclerosis* 1999;5:22-28.
- Loeser RF, Varnum BC, Carlson CS, Goldring MB, Liu ET, Sadiev S, Kute TE, Wallin Human chondrocyte expression of growth-arrest-specific gene 6 and the tyrosine kinase receptor axl: potential role in autocrine signaling in cartilage. *Arthritis Rheum* 1997;40:1455-1465.
- Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, Lai C, Skinner MK, Klein R, Matsushima GK, Earp HS, Goff SP, Lemke G. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* 1999; 398:723-8.
- Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* 2001;293:306-11.
- Lublin FD and Reingold SC for the National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of new Agents in Multiple Sclerosis. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology* 1996;46:907-911.
- Luscinskas FW, Lawler J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J* 1994; 8:929-38.
- Mahad DJ, Howell SJL, Woodroffe MN. Expression of chemokines in cerebrospinal fluid and serum of patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:320-3.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55-60.
- Malonne H, Langer I. Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. *Clinical Experimental Metastasis* 1999;17:1-14.
- Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (Gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* 1993;13:4976-85

- Manzow S, Brancolini C, Marks F, Richter KH. Expression of growth arrest-specific (Gas) genes in murine keratinocytes: Gas2 is specifically regulated. *Exp Cell Res* 1996;224:200-3.
- Mark MR, Scadden DT, Wang Z, Gu Q, Goddard A, Godowski PJ. Rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain. *J Biol Chem* 1994;269:10720-8.
- Masabumi S. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Sci* 2003;94:751-6.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinschenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-7.
- McKhann GM, Cornblath DR, Griffin JW, Ho TW, Li CY, Jiang Z, Wu HS, Zhaori G, Liu Y, Jou LP. Acute motor axonal neuropathy: a frequent cause of acute flaccid paralysis in China. *Ann Neurol* 1993;33:333-42.
- Melaragno MG, Wuthrich DA, Poppa V, Gill D, Lindner V, Berk BC, Corson MA. Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats. *Circ Res* 1998;83:697-704.
- Meléndez-Vásquez C, Redford J, Choudhary PP, Gray IA, Maitland P, Gregson NA, Smith KJ, Hughes RA. Immunological investigation of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* 1997;73:124-34.
- Merrick DT, Haney J, Petrunich S, Sugita M, Miller YE, Keith RL, Kennedy TC, Franklin WA. Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dysplasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis. *Lung Cancer* 2005;48:31-45.
- Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Austin HG. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* 1999;18:363-74.
- Mignatti P, Rifkin DB. Nonenzymatic interactions between proteinases and the cell surface: novel roles in normal and malignant cell physiology. *Adv Cancer Res* 2000;78:103-57.
- Moller LB. Structure and function of the urokinase receptor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993;4:293-303.
- Mygland A, Monstad P. Chronic acquired demyelinating symmetric polyneuropathy classified by pattern of weakness. *Arch Neurol* 2003;60:260-4.
- Nagai K, Arai H, Yanagita M, Matsubara T, Kanamori H, Nakano T, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T. Growth arrest-specific gene 6 is involved in glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. *J Biol Chem* 2003;278:18229-34.
- Nakano T, Higashino K, Kikuchi N, Kishino J, Nomura K, Fujita H, Ohara O, Arita H. Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors. *J Biol Chem* 1995;270:5702-5.

- Nakano T, Kawamoto K, Kishino J, Nomura K, Higashino K, Arita H. 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* 1997; 323:387-92.
- Neubauer A, Burchert A, Maiwald C, Gruss HJ, Serke S, Huhn D, Wittig B, Liu E. Recent progress on the role of Axl, a receptor tyrosine kinase, in malignant transformation of myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma* 1997;25(1-2):91-6.
- Neubauer A, Fiebeler A, Graham DK, O'Bryan JP, Schmidt CA, Barckow P, Serke S, Siegert W, Snodgrass, HR, Huhn D. Expression of Axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 1994; 84:1931-41.
- Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:13-9.
- Neufeld G, Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008;8:632-45.
- Nguyen M, Strubel NA, Bischoff J. A role for sialyl Lewis-X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis. *Nature* 1993;365:267-9
- Sharif MN, Sosic D, Rothlin CV, Kelly E, Lemke G, Olson EN, Ivashkiv LB. Twist mediates suppression of inflammation by type I IFNs and Axl. *J Exp Med* 2006;203:1891-901.
- O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET. Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukaemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1991;11:5016-31.
- O'Donnell K, Harkes IC, Dougherty L, Wicks IP. Expression of receptor tyrosine kinase Axl and its ligand Gas6 in rheumatoid arthritis: evidence for a novel endothelial cell survival pathway. *Am J Pathol* 1999;154:1171-80.
- Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y e Shibuya M. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* 1998;273:31273-82.
- Ozaki H, Okamoto N, Ortega S, Chang M, Ozaki K, Sadda S, Vinos MA, Derevjani N, Zack DJ, Basilico C, Campochiaro PA. Basic fibroblast growth factor is neither necessary nor sufficient for the development of retinal neovascularization. *Am J Pathol* 1998;153:757-65.
- Pan Q, Chanthery Y, Liang WC, Stawicki S, Mak J, Rathore N, Tong RK, Kowalski J, Yee SF, Pacheco G, Ross S, Cheng Z, Le Couter J, Plowman G, Peale F, Koch AW, Wu Y, Bagri A, Tessier-Lavigne M, Watts RJ. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* 2007;11:53-67.
- Parker LH, Schmidt M, Jin SW, Gray AM, Beis D, Pham T, Frantz G, Palmieri S, Hillan K, Stainier DY, De Sauvage FJ, Ye W. The endothelial-cell-derived secreted factor Egl7 regulates vascular tube formation. *Nature* 2004;428:754-8.

- Press R, Pashenkov M, Jin JP, Link H. Aberrated levels of cerebrospinal fluid chemokines in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Clin Immunol* 2003;23:259-67.
- Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:159-78.
- Previtali SC, Feltri ML, Archelos JJ, Quattrini A, Wrabetz L, Hartung H. Role of integrins in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 2001;64:35-49.
- Prieto AL, Weber JL, Lai C. Expression of the receptor protein-tyrosine kinases Tyro-3, Axl, and Mer in the developing rat central nervous system. *J Comp Neurol* 2000;425:295-314.
- Prieto AL, Weber JL, Tracy S, Heeb MJ, Lai C. Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system. *Brain Res* 1999;816:646-61.
- Quattrini A, Previtali SC, Kieseier BC, Kiefer R, Comi G, Hartung HP. Autoimmunity in the peripheral nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 2003;15:1-39.
- Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001;184:101-22.
- Rennel ES, Hamdollah-Zadeh MA, Wheatley ER, Magnussen A, Schüler Y, Kelly SP, Finucane C, Ellison D, Cebe-Suarez S, Ballmer-Hofer K, Mather S, Stewart L, Bates DO, Harper SJ. Recombinant human VEGF165b protein is an effective anti-cancer agent in mice. *Eur J Cancer* 2008;44:1883-94.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4.
- Ropper AH. 1992. The Guillain-Barré syndrome. *N Eng J Med* 326:1130-1136.
- Ruch C, Skiniotis G, Steinmetz MO, Walz T, Ballmer-Hofer K. Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:249-50.
- Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* 2002;16:2684-98.
- Said G, Hontebeyrie-Joskowicz M. Nerve lesions induced by macrophage activation. *Res Immunol* 1992;143:589-99.
- Said G. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neuromuscul Disord* 2006;16:293-303.
- Sainaghi PP, Alciato F, Carnieletto S, Castello L, Bergamasco L, Sola D, Bongo AS, Inglese E, Polosa R, Avanzi GC. Gas6 evaluation in patients with acute dyspnea due to suspected pulmonary embolism. *Respir Med* 2009;103:589-94.
- Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol* 2005; 204:36-44.

- Sainaghi PP, Collimedaglia L, Alciato F, Leone MA, Puta E, Naldi P, Castello L, Monaco F, Avanzi GC. Elevation of Gas6 protein concentration in cerebrospinal fluid of patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *J Neurol Sci* 2008;269(1-2):138-42.
- Salomon B, Rhee L, Bour-Jordan H, et al. Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J Exp Med* 2001;194:677-84.
- Salomon D, Ayalon O, Patel-King R, Hynes RO, Geiger B. Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *J Cell Sci* 1992;102:7-17
- Sander HW, Latov N. Research criteria for defining patients with CIDP. *Neurology* 2003;60:Suppl 3:S8-S15.
- Saperstein DS, Katz JS, Amato AA, Barohn RJ. Clinical spectrum of chronic acquired demyelinating polyneuropathies. *Muscle Nerve* 2001;24:311-24.
- Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 1988; 54:787-93.
- Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci*, 1965;122:552-568.
- Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, Earp HS, Matsushima GK. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 2001;411:207-11.
- Sen P, Wallet MA, Yi Z, Huang Y, Henderson M, Mathews CE, Earp HS, Matsushima G, Baldwin AS Jr, Tisch RM. Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF-kappaB activation in dendritic cells. *Blood* 2007;109:653-60.
- Serini G, Valdembri D, Zanivan S, Morterra G, Burkhardt C, Caccavari F, Zammataro L, Primo L, Tamagnone L, Logan M, Tessier-Lavigne M, Taniguchi M, Puschel AW, Bussolino F. Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature* 2003;424:391-7.
- Shankar SL, O'Guin K, Cammer M, Mc Morris F:SA, Stitt TN, Basch RS, Varnum B, Shafit-Zagardo B. The growth arrest-specific gene product Gas6 promotes the survival of human oligodendrocytes via a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Neurosci* 2003;23:4208-18.
- Shankar SL, O'Guin K, Kim M. Gas6/Axl signaling activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt1 survival pathway to protect oligodendrocytes from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Neurosci* 2006;24:5638-48.
- Shao WH, Zhen Y, Eisenberg RA, Cohen PL. The Mer receptor tyrosine kinase is expressed on discrete macrophage subpopulations and mainly uses Gas6 as its ligand for uptake of apoptotic cells. *Clin Immunol* 2009;133:138-44.
- Sharif MN, Sobic D, Rothlin CV, Kelly E, Lemke G, Olson EN, Ivashkiv LB. Twist mediates suppression of inflammation by type I IFNs and Axl. *J Exp Med* 2006;203:1891-901.

- Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006;312:549-60.
- Shim WS, Ho IA, Wong PE. Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res* 2007;5:655-65.
- Siekman AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature* 2007;445:781-4.
- Sivieri S, Ferrarini AM, Lolli F, Matà S, Pinto F, Tavolato B, Gallo P. Cytokine pattern in the cerebrospinal fluid from patients with GBS and CIDP. *J Neurol Sci* 1997;147:93-5.
- Sivridis E, Giatromanolaki A e Koukourakis MI. The vascular network of tumours-what is it not for? *J Pathol* 2003; 201:173-80.
- Sotgiu S, Pugliatti M, Fois ML, Arru G, Sanna A, Sotgiu MA, Rosati G. Genes, environment, and susceptibility to multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2004;17:131-43.
- Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Path* 2004;85:233-48.
- Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* 1995;80:661-70.
- Stoeltzing O, Ahmad SA, Liu W, McCarty MF, Wey JS, Parikh AA, Fan F, Reinmuth N, Kawaguchi M, Bucana CD, Ellis LM. Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer Res* 2003;63:3370-7.
- Stokes CL, Rupnick MA, Williams SK, Lauffenburger DA. Chemotaxis of human microvessel endothelial cells in response to acidic fibroblast growth factor. *Lab Invest* 1990;63:657-68.
- Streit M, Detmar M. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene* 2003;22:3172-79.
- Sun WS, Fujimoto J, Tamaya T. Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases Axl and Sky in human uterine endometrial cancers. *Ann Oncol* 2003;14:898-906.
- Sun WS, Misao R, Iwagaki S, Fujimoto J, Tamaya T. Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases, Axl and Sky, in human uterine endometrium and ovarian endometriosis. *Mol Hum Reprod* 2002;8:552-8.
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171-80.
- Tomanek RJ, Sandra A, Zheng W, Brock T, Bjercke RJ, Holifield JS. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor differentially modulate early postnatal coronary angiogenesis. *Circ Res* 2001;88:1135-41.
- Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene* 2003; 22:6549-56.

Tulis DA, Mnjoyan ZH, Schiesser RL, Shelat HS, Evans AJ, Zoldhelyi P, Fujise K. Adenoviral gene transfer of fortilin attenuates neointima formation through suppression of vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circulation* 2003;107:98-105.

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

Underwood PA, Bean PA, Gamble JR. Rate of endothelial expansion is controlled by cell:cell adhesion. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34:55-69.

Van Rhijn I, Van den Berg LH, Bosboom WM, Otten HG, Logtenberg T. Expression of accessory molecules for T-cell activation in peripheral nerve of patients with CIDP and vasculitic neuropathy. *Brain* 2000;123:2020-9.

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

Victor M, Ropper AH. *Adams & Victor's Principles of Neurology*. McGraw-Hill, Edition: 8th ed, 2005.

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

Weinger JG, Omari KM, Marsden K, Raine CS, Shafit-Zagardo B. Up-regulation of soluble Axl and Mer receptor tyrosine kinases negatively correlates with Gas6 in established multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 2009;175(1):283-93.

Wimmel A, Glitz D, Hraus A, Roeder J, Schuermann M. Axl receptor tyrosine kinase expression in human lung cancer cell lines correlates with cellular adhesion. *Eur J Cancer* 2001;37:2264-74.

Yagami T, Ueda K, Asakura K, Noboru O, Sakaeda T, Sakaguchi G, Itoh N, Hashimoto Y, Nakano T, Fujimoto M. Effect of Gas6 on secretory phospholipase A2-IIA-induced apoptosis in cortical neurons. *Brain Res* 2003;985:142-9.

Yagami T, Ueda K, Asakura K, Sakaeda T, Nakazato H, Kuroda T, Hata S, Sakaguchi G, Itoh N, Nakano T, Kambayashi Y, Tsuzuki H. Gas6 rescues cortical neurons from amyloid β protein-induced apoptosis. *Neuropharmacology* 2002;43:1289-96.

Yanagita M, Arai H, Ishii K, Nakano T, Ohashi K, Mizuno K, Varnum B, Fukatsu A, Doi T, Kita T. Gas6 regulates mesangial cell proliferation through Axl in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2001;158:1423-32.

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

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

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessels formation. *Nature* 2000;407:242-8.

Yuki N, Yamada M, Koga M, Odaka M, Susuki K, Tagawa Y, Ueda S, Kasama T, Ohnishi A, Hayashi S, Takahashi H, Kamijo M, Hirata K. Animal model of axonal Guillain-Barré syndrome induced by sensitization with GM1 ganglioside. *Ann Neurol* 2001;49:712-20.

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

Zhou M, Sutliff RL, Paul RJ, Lorenz JN, Hoying JB, Haudenschild CC, Yin M, Coffin JD, Kong L, Kranias EG, Luo W, Boivin GP, Duffy JJ, Pawlowski SA, Doetschman T. Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nat Med* 1998; 4:201-7.