

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA
SCUOLA DI DOTTORATO:



**CORSO DI DOTTORATO IN IMMUNOLOGIA CLINICA E
SPERIMENTALE**

XXXI CICLO

TESI DI DOTTORATO

“Proprietà immunoregatorie del DNA circolante”

COORDINATORE DEL CORSO DI DOTTORATO

C.ma Prof. Maria Cristina Mingari

RELATORE

C.mo Prof. Gilberto Filaci

CANDIDATA

Tiziana Altosole

Sommario

Introduzione	3
Risultati.....	6
Il DNA lega MHC II (I-A) murino.....	6
Attività immunoregulatoria del DNA	9
Docking analyses	11
L'interazione tra DNA e MHC II attiva un signaling intracellulare.....	13
Localizzazione ed effetti del cirDNA in vivo	17
Materiali e metodi.....	23
Modelli murini	23
Linee cellulari e colture	23
Pazienti oncologici.....	23
Fonte e quantificazione di DNA.....	24
Somministrazione in vivo	24
Quantificazione ex vivo	25
Localizzazione di DNA ex vivo e Citometria.....	25
Test di proliferazione antigene specifico	26
South-westernblot	27
Espressione genica	28
Analisi di modeling molecolare	28
Analisi statistica.....	30
Discussione	31
Bibliografia	36
Allegati.....	41

Introduzione

Il DNA circolante (cDNA) fu identificato per la prima volta da Mandel e Metais nel 1948 [1]. È rilevabile in plasma sano a concentrazioni ≤ 5 ng / ml [2] mentre si osservano concentrazioni più elevate in pazienti affetti da tumore o vasculite[3].

Le fonti di cDNA nella circolazione plasmatica sono principalmente cellule apoptotiche e necrotiche esistono anche evidenze di un meccanismo di secrezione attiva [4]. Alterazioni qualitative e quantitative del cDNA sono state dimostrate in pazienti oncologici, suggerendo che l'analisi del cDNA potrebbe rappresentare un utile biomarker nel cancro [5]. Il ruolo biologico del cDNA è controverso.

Dalla scoperta dei PPRs (recettori che riconoscono i patogeni) e dei sensori del DNA endosomale e citosolico, il DNA extracellulare è sempre stato classificato come “segnale di pericolo” in grado di attivare una risposta immune innata.[6] I principali sensori del DNA sono infatti in grado di innescare risposte di tipo infiammatorio[7]. TLR9, uno dei primi sensori scoperti, è un recettore del DNA citoplasmatico che capta sequenze di CpG, DNA non metilato derivato da sequenze batteriche[8]. Questa interazione attiva MyD88 un adattatore che innesci un segnale che termina a valle con una cascata pro infiammatoria quale produzione di interferoni di tipo uno e signaling pro infiammatori (NFkB)[9]. STING è un omodimero citosolico con caratteristiche pleiotropiche. Il DNA è coinvolto nell'attivazione di STING attraverso legame diretto [10] e legando altri sensori citoplasmatici tra i quali DAI , IFI16, DDX41, DNA- PKcs, Mrel1[9] [11] and cGAS [9, 12, 13]. In seguito all'attivazione STING interagisce con gli adattatori TBK1 per attivare IRF3 per indurre IFN-I in particolare IFN β . STING interagisce anche con il fattore di inibizione kB attivando NFkB che induce la produzione di citochine infiammatorie come TNF α , IL-6, and IL-12 [14]

Alcuni sensori del DNA tra cui TLR9 e STING sembrerebbero svolgere anche funzioni tollerogeniche. La delezione di TLR9 infatti sembra accelerare l'insorgenza della patologia in

topi lupici MRLlpr. [15]. Relativamente a STING invece, la delezione di questo gene e IRF3 porta ad un incremento della protezione contro le infezioni da listeria[16], inoltre l'attivazione di STING con nanoparticelle cargo di DNA protegge i topi dall' sviluppo di artrite e da encefalite autoimmune attraverso l'induzione di IDO. [17-19]. Queste osservazioni suggeriscono che il DNA può anche attivare pathways regolatori a discapito di quelli infiammatori.

E' improbabile che questi sensori citosolici del DNA possano rappresentare i recettori del DNA circolante (cDNA), poiché ciò sarebbe in conflitto con la necessità di tollerare il cDNA autologo in condizioni fisiologiche, quali la gravidanza, in cui esiste un incremento di cDNA [20]. Inoltre, il concetto che il DNA eserciti solo attività pro-infiammatorie lascia inspiegabile come la presenza di alte concentrazioni di cDNA possa essere associata a condizioni caratterizzate da tolleranza immunitaria e grado variabile di immunodeficienza come i tumori. Un'ipotesi per spiegare questa controversia è che il cDNA potrebbe anche esercitare attività immunoregolatrici attraverso l'interazione con ligandi ancora sconosciuti. Esplorando questa possibilità, esperimenti pionieristici sono stati condotti nel nostro laboratorio i cui risultati hanno suggerito che il DNA, sotto forma di DNA genomico, sintetico o apoptotico, può esercitare attività inibitoria sulle cellule immunitarie umane. Non è noto se questa attività sia peculiare per gli esseri umani o sia una funzione costitutiva del DNA rilevabile anche in altre specie.

E' stato dimostrato in passato su PBMC, che l'HLA di classe II umano è capace di legare molecole di DNA e che questa interazione induce una riduzione della presentazione antigenica e limita le APC nello svolgimento delle loro attività. E' stato supposto che questo effetto sia mediato dalla competizione del DNA libero circolante con l'antigene per il legame su MHC II e dal rilascio di citochine anti-infiammatorie. [21, 22]

Per meglio analizzare le funzioni immunoregatorie del DNA e definirne la rilevanza in vivo, è stato condotto uno studio nel quale il DNA è stato somministrato per via endovenosa (in modo

da replicare concentrazioni ed effetti del DNA circolante) in due antitetici modelli sperimentali animali, uno prototipico di malattia infiammatoria (il LES) e l'altro esemplificativo di condizione tollerogenica (challenge tumorale).

Risultati

Per identificare in vivo gli effetti di tale interazione, gli esperimenti sono stati replicati in vitro su cellule murine, il DNA è poi stato somministrato in vivo ad animali affetti da una patologia autoimmune (lupus) o oncologica (melanoma) e sono stati studiati gli effetti immunologici.

Per mimare gli effetti del DNA circolante è stato utilizzato Poly-CG DNA.

Il DNA lega MHC II (I-A) murino

In lavori precedenti era stato dimostrato che il DNA interagisce con le molecole di HLA di classe II [21]. Dal momento che lo scopo dello studio sarebbe stato quello di analizzare gli effetti in vivo del cDNA circolante in modelli sperimentali animali, per prima cosa era necessario verificare che tale interazione non fosse specie-specifica e che, quindi, il cDNA fosse in grado di legare le molecole MHC di classe II (MHC II) murine. A tale scopo è stato allestito un south-westernblot (figura 1A), una tecnica che permette di studiare le interazioni tra DNA e proteine. Un lisato cellulare ottenuto da splenociti di un ceppo murino C57Bl esprime MHC II I-A^d I-E^u è stato blottato in doppio su una membrana di nitrocellulosa e rivelato sia con anticorpi anti-MHC II che anti-dsDNA. I risultati hanno mostrato che in entrambi i casi le bande di migrazione elettroforetica si localizzano ad un'altezza che indica un peso molecolare di 61 kD corrispondente al peso molecolare di MHC II. Questo risultato indica che, oltre a quella tra HLA II umano e DNA, esiste un'interazione tra MHC II murino e DNA.

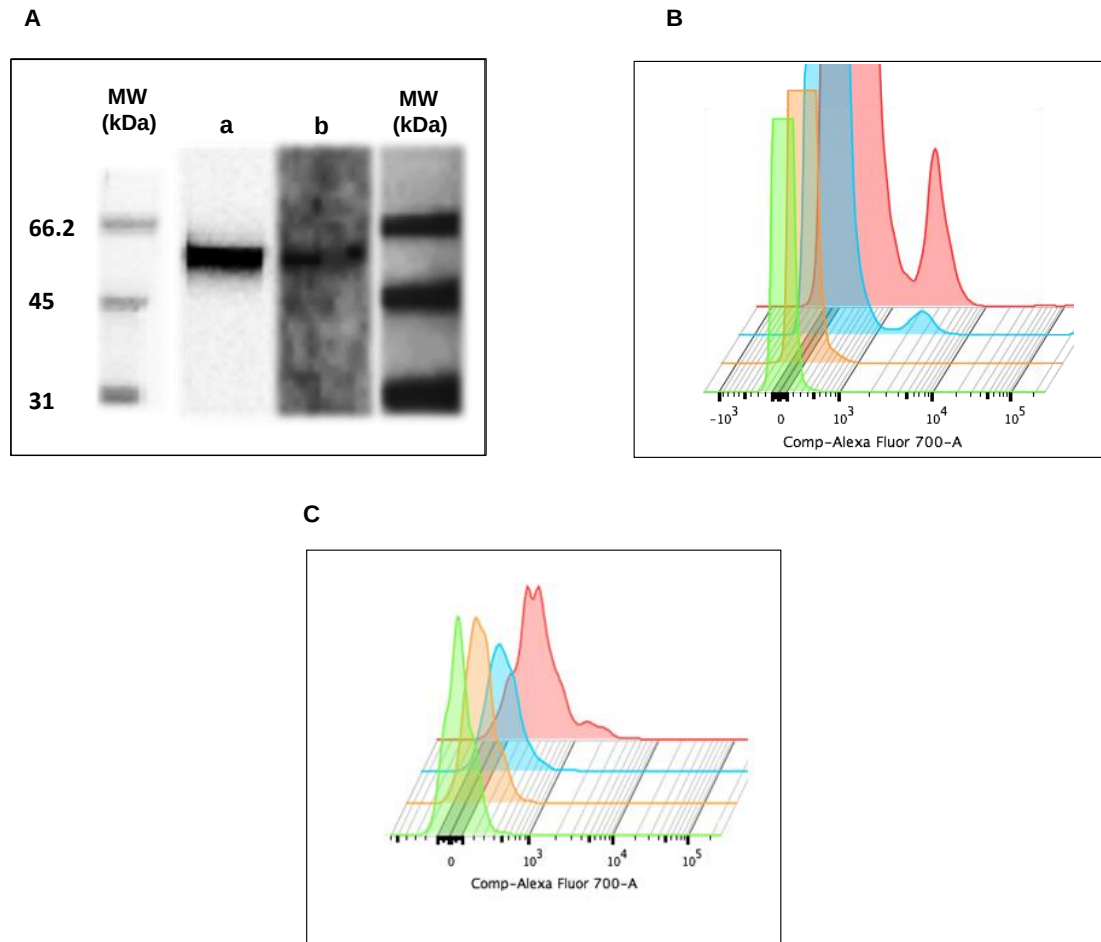


Figura 1. Il DNA si lega alle molecole di MHC II **A)** Lisato di splenociti corso in doppio su gel SDS-PAGE (a, b) e blottato su una membrana di nitrocellulosa. La membrana è stata incubata con anti MHC II I-A^d monoclonale (colonna a) e anti dsDNA (colonna b) monoclonale. Le colonne a destra e sinistra rappresentano lo standard. Le bande indicano un peso molecolare di 61 kDa (peso della molecola di MHC II) in entrambe le condizioni. **B)** Gli istogrammi rappresentano uno di 3 esperimenti concordanti. Gli splenociti di C57Bl sono stati incubati con anti-CD3 monoclonale per identificare la popolazione T e con anticorpi anti-MHC II. Sono state confrontate le MFI relative alla fluorescenza del Poly-CG DNA marcato con Cy5.5. Nel dettaglio i picchi di colore verde, arancione, blu e rosso rappresentano rispettivamente l'MFI Cy 5.5 delle cellule MHC II negative, MHC II positive, MHC II negative incubate con Poly-CG-Cy5.5 e MHC II positive incubate con Poly-CG-Cy5.5. **C)** Gli istogrammi rappresentano uno di 3 esperimenti concordanti. Gli splenociti di C57Bl sono stati incubati con anti-CD11b monoclonale per identificare i monociti e con anticorpi anti-MHC II. E' stata confrontata la MFI relativa alla fluorescenza del Poly-CG DNA marcato con Cy5.5. Nel dettaglio i picchi verde arancione blu e rosso rappresentano rispettivamente l'MFI Cy 5.5 delle cellule MHC II negative, MHC II positive, MHC II negative incubate con Poly-CG-Cy5.5 e MHC II positive incubate con Poly-CG-Cy5.5.

Per validare questa osservazione, splenociti di C57Bl sono stati incubati con DNA fluorescente. Le figure 1B e 1C mostrano un incremento del legame di DNA fluorescente in termini di MFI (intensità di fluorescenza media) sulle cellule CD11b e CD3 MHC II positive rispetto alle cellule MHC II negative. Nella tabella 1 sono rappresentate le percentuali di cellule leganti il DNA all'interno delle popolazioni CD3 e CD11b; le popolazioni MHC II positive che legano il DNA sono percentualmente maggiori rispetto alle MHC II negative (i dati rappresentano la media di tre esperimenti).

Tabella 1. Legame di Poly-CG—Cy5.5 su cellule MHC II+

	% poly GC+ / cellule MHC-	% poly GC+ / celluleMHC+
CD3+	5,26	8,20
CD11b+	31,37	45,21

Tabella 1. Legame di Poly-CG—Cy5.5 su cellule MHC II+ Percentuale di cellule MHC II positive e negative che legano Poly-CG. Le percentuali sono state valutate sulle popolazioni CD3+ e CD11b+.

Attività immunoregolatoria del DNA

L'MHC II è un marcatore fondamentale delle cellule presentanti l'antigene necessario per la presentazione dell'antigene ai linfociti CD4+. Nei pazienti affetti da tumore le concentrazioni plasmatiche di DNA circolante sono più elevate rispetto ai soggetti sani [23]: si può quindi ipotizzare che il DNA circolante di tali pazienti possa indurre una attività immuno-regolatoria alterando la funzione delle cellule presentanti l'antigene e contribuendo in parte ai meccanismi di immunoescape. Per poter studiare tale attività, sono stati effettuati esperimenti di proliferazione antigene-specifica utilizzando splenociti di topi immunizzati con ovalbumina. Gli splenociti sono stati messi in coltura in presenza o meno di ovalbumina, DNA sottoforma di Poly-CG e DNA circolante ottenuto da sieri di pazienti oncologici (tabella 2). La proliferazione è stata valutata come diluizione del CFSE.

I risultati hanno mostrato che il Poly-CG e il DNA circolante riducono in maniera significativa ($P= 0,04$ e $P= 0,004$) la proliferazione antigene specifica (Figura 2A e 2B). I risultati mostrati sono la media di sei esperimenti indipendenti e concordanti.

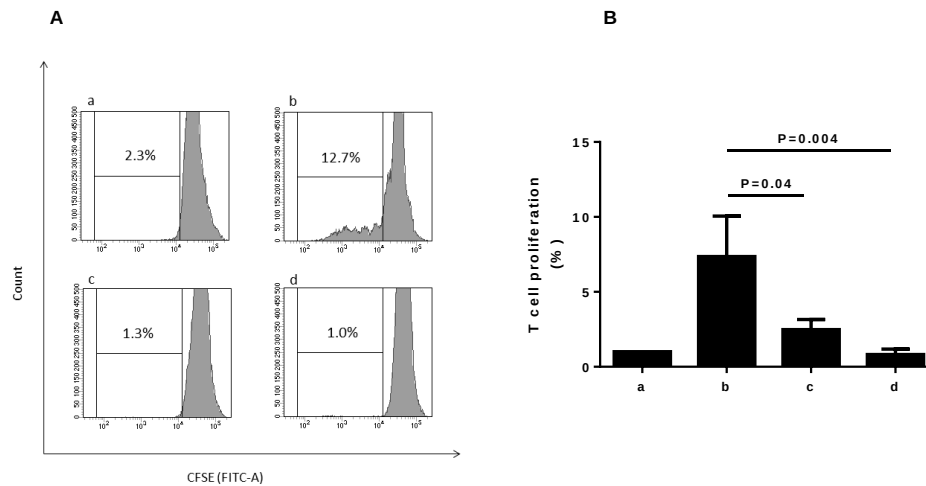


Figura 2– Il DNA inibisce la proliferazione antigene specifica. **A)** Gli istogrammi rappresentano la strategia di gating per determinare la percentuale di cellule proliferanti (esperimento rappresentativo di sei). Le lettere indicano che gli splenociti sono stati posti in coltura rispettivamente con: (a) splenociti autologhi irradiati, (b) splenociti autologhi irradiati più ovalbumina, (c) splenociti autologhi irradiati più ovalbumina più Poly-CG (100 ng/ml), (d) splenociti autologhi irradiati più ovalbumina più cirDNA da plasma di pazienti oncologici (2.5 ng/ml). **B)** Il grafico mostra la proliferazione media di sei esperimenti nelle condizioni a, b, c, d come sopra indicato.

Tabella 2. Effetti del cDNA derivato da pazienti oncologici sulla proliferazione T antigene

cDNA n.	OVA*	OVA + cDNA**
	% di cellule T proliferanti	% di cellule T proliferanti (% di inibizione)
1(da paziente#1 a #4)	25%	1% (96%)
2(da paziente #5 a #7)	16%	0.1% (99%)
3(da paziente #8 a #10)	18%	2.5% (86%)

Tabella 2. La tabella mostra le percentuali di proliferazione (tra parentesi di inibizione) della proliferazione antigene specifica di tre esperimenti rappresentativi. Gli splenociti sono stati posti in coltura con splenociti autologhi irradiati in presenza di ovalbumina con e senza DNA circolante.

Quindi il DNA svolge un ruolo nella regolazione delle attività immunologiche alterando la presentazione dell'antigene. Questi risultati, addizionati ai dati raccolti sulle interazioni tra DNA e MHC II suggeriscono che il DNA compete fisicamente con il legame dell'antigene sulla cellula presentante l'antigene..

Docking analyses

Abbiamo costruito in silico un modello tridimensionale della proteina MHC di classe II confrontando le coordinate delle corrispondenti catene alfa e beta, disponibili presso il database di proteine disponibili presso il database PDB (protein databank) cod.pdb 1IEB e 1MUJ, rispettivamente.

La geometria del modello ottenuto, perfezionata con metodi di minimizzazione energetica, ha portato al modello finale come illustrato nella Figura 3A.

Una valutazione preliminare delle cavità più rilevanti della proteina, che potrebbero essere coinvolte nel legame del ligando e / o nei contatti proteina-proteina, è stata eseguita eseguendo il modulo site finder implementato nel software MOE (come precedentemente fatto con successo in altri casi studio[24]. Lo scopo di Site Finder è di calcolare i possibili siti attivi in un recettore dalle coordinate atomiche 3D del recettore stesso. Tale calcolo è utile per guidare gli esperimenti di mutagenesi sito-diretta e per esplorare i siti di legame del ligando.

Il Site Finder di MOE rientra nella categoria dei metodi geometrici nella ricerca del possibile sito di legame, poiché non vengono utilizzati modelli energetici. Invece, vengono considerate le posizioni relative e l'accessibilità degli atomi del recettore, insieme a una classificazione approssimativa del tipo chimico. La metodologia di Site Finder ruota attorno allo sviluppo e all'abbinamento con la proteina di Alpha Spheres, con un diverso profilo di polarità. In breve, il metodo agisce come segue: (i) Identifica regioni di stretto ingombro sterico, anche sulla superficie della proteina. (ii) Filtrare i siti che sono "troppo esposti" al solvente e conservare tutti gli altri che sono ulteriormente classificati in base alle loro proprietà idrofobiche / idrofile.

Questo viene fatto raccogliendo un numero variabile delle suddette Alpha Spheres, che si adattano correttamente a qualsiasi possibile sito di legame.

Secondo i nostri risultati, la cavità con il punteggio migliore è stata delimitata da I7, Q9, E11, F22, F24, I31, F32, W43, A52, S53, F54, G58, A59, N62, V65, D66, N69 nella catena alfa e da F11, G13, Y26, T28, Y30, H47, W61, I67, R70, T71, E74, T77, V78, H81, N82, P85, E86, T89 all'interno della catena beta.

Una rappresentazione schematica delle aree idrofiliche e idrofobe di questa fessura è mostrata rispettivamente dalle sfere rosse e grigie nella Figura 3B.

Al fine di perfezionare e confermare questi risultati, abbiamo esplorato in particolare la superficie del nostro modello di proteine al fine di identificare qualsiasi regione molto incline all'aggregazione delle proteine, o il supporto per siti di legame proteina-proteina (cioè aree patch). I dati finali hanno rivelato cinque aree di patch, numerate come patch 1-5, che presentano superfici caricate negativamente (rosso), o caricate positivamente (blu) o idrofobiche (verdi), come mostrato nella Figura 3B. Le proprietà specifiche dei suddetti cerotti sono riassunte e elencate nella Tabella 3.

Patch Number	Patch Type	Area (Å ²)	Residues	
			Alpha chain	Beta chain
1	Negatively-charged	140	Q9, E11, G58, A61, N62, V65, D66	F11, Y26, T28, T71, E74, V78
2	Hydrophobic	130	F22, F24, I31, F32, W43, A52, S53, F54	T77, V78, P85, T89
3	Hydrophobic	110	--	Y30, H47, Y60, W61, Q64, I67
4	Positively-charged	70	--	I67, R70
5	Positively-charged	60	E47, K50, F51	R92

Tabella 3 Profilo elettrostatico dell'area superficiale delle posizioni di patch più rilevanti ottenute mediante studi di modellizzazione molecolare.

In particolare, questi risultati hanno chiarito alcune tasche della proteina modellata comprese le stesse regioni rilevate dai calcoli sopra menzionati con l'analisi del sito (figura 3B). Ciò è supportato per le seguenti simulazioni di docking molecolare con poly-CG, da eseguire in questa regione della macromolecola. Inoltre, la presenza delle due aree a carica positiva (4 e 5), che erano l'unica coppia di punti di docking per i gruppi fosfato caricati negativamente di

poly-CG rilevati sulla superficie MHC-II, ha definitivamente permesso di riconoscere il corrispondente dominio vincolante. Infine, i calcoli di docking hanno rivelato la possibile modalità di legame del poly-CG sulla superficie MHC-II, come mostrato nella Figura 3C, basandosi principalmente sui contatti elettrostatici tra i gruppi fosfato di cui sopra e il dominio 4 e 5 a carica positiva. Inoltre, i contatti del legame ad idrogeno sono stati rilevati tra i gruppi fosfato poli-CG e il backbone dei residui della catena alfa W43, S53 e F54 (patch 2) (Figura 3D). Quindi, l'analisi del modello supporta definitivamente la possibilità di legame tra DNA e molecole di classe II MHC identificando nel solco antigenico le aree di interazione molecolare.

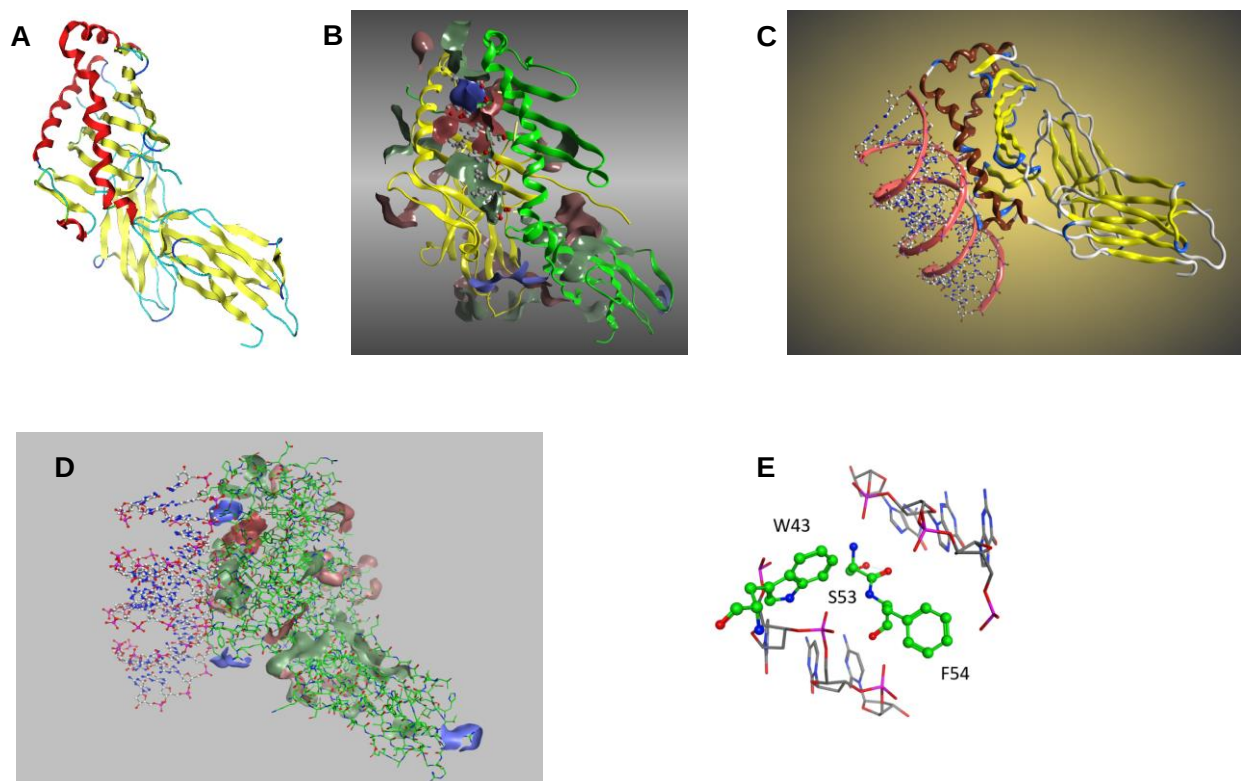


Figura 3. Analisi di ancoraggio sul complesso poli-CG di classe II MHC. A) Modello tridimensionale del complesso MHC-II analizzato. Alpha elica e foglietti beta sono colorati rispettivamente in rosso e giallo. B): Il sito di legame con il miglior punteggio nel complesso MHC-II è rappresentato da sfere rosse e grigie, insieme alle aree di patch calcolate dal modulo analizzatore di patch implementato in MOE. C) e D) viene mostrato il Docking di poly-CG sulla superficie del modello MHC-II, insieme alle aree di patch più rilevanti (in Fig. D) identificato da studi di modellistica molecolare. E) contatti chiave relativi all'attracco di poly-CG nel modello MHC-II.

L'interazione tra DNA e MHC II attiva un signaling intracellulare

Per studiare il signaling indotto dall'interazione con questo recettore, è stata analizzata nel dettaglio l'espressione di alcuni geni coinvolti nei pathway di trascrizione del segnale, di presentazione antigenica e nella produzione di citochine. E' stata utilizzata una linea cellulare di

macrofagi peritoneali di topi C57Bl MHC II positiva, le PMJ2-PC. Le cellule sono state attivate con LPS (1 ug/ml) e poi trattate con Poly-CG 10 ug/ml. L'analisi in PCR ha mostrato variazioni significative a carico dell'espressione dei seguenti geni (vedi allegati): Egr1, grb2, nfkbie, Mapk14. Questi geni sono quindi stati selezionati per analisi più approfondite utilizzando le PMJ2-PC attivate con LPS (1 ug/ml) e trattate con Poly-CG a diverse concentrazioni. L'espressione dei geni selezionati è stata quantificata in realtime-PCR.

Tabella 4 Realtime PCR dei geni con variazione significativa

	[Poly-CG]	Grb2	Mapk14	Egr1	Nfkbie
no LPS	NT	1	1	1	1
	1 ng/ml	1	1	1	1
	100 ng/ml	1	1	1	1
	1 ug/ml	1	1	1	1
LPS 1ug	NT	3.945	8.34	54.569	18.636
	1 ng/ml	2.204	4.659	56.493	4.993
	100 ng/ml	0.908	0.198	0.059	0.093
	1 ug/ml	1.042	0.113	0.46	0.059

Tabella 4. Realtime PCR dei geni con variazione significativa. La tabella mostra i valori di espressione genica indicati come $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ovvero quantificazione relativa al non trattato con Poly-CG. Sono mostrati i risultati ottenuti a diverse concentrazioni di Poly-CG DNA e in presenza o meno di LPS.

L'analisi delle realtime mette in evidenza gli effetti del DNA su una condizione di stimolo infiammatorio classico quale quello indotto da LPS sui macrofagi. La tabella 4 permette di valutare gli effetti del DNA sull'espressione dei geni selezionati, distinguendo la condizione infiammatoria indotta da LPS dalla condizione di quiescenza.

Dai risultati mostrati in tabella 4 si può osservare che LPS induce un netto incremento dell'espressione di Grb2, Mapk14, Nfkbie, Egr1. Il trattamento con Poly-CG DNA induce una diminuzione dell'espressione dei geni Grb2, Mapk14, Nfkbie, Egr1 in maniera proporzionale alle concentrazioni di Poly-CG DNA testate.

I sovranatanti, ottenuti dal terreno di coltura delle cellule trattate, sono stati analizzati in ELISA per valutare alcune citochine IL1b, IL-12, MDC, MIG, TNFa, CCL22 rilasciate in seguito al trattamento con Poly-CG. Tra le citochine analizzate CCL22, una chemochina coinvolta nel

reclutamento dei linfociti T regolatori, ha mostrato un incremento significativo (dati non mostrati). Questo risultato è stato confermato in termini di espressione genica tramite realtime PCR. (Figura 4).

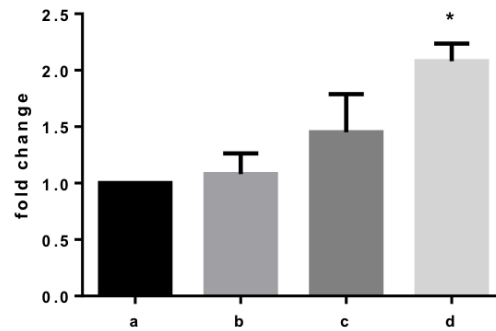


Figura 4. Espressione genica di CCL22. Gli istogrammi rappresentano la variazione dell' espressione genica di CCL22 sulle cellule PMJ2-PC in seguito a 3h di trattamento con diverse concentrazioni di Poly-CG DNA. (a) PMJ2-PC non trattate, (b) 1 ng/ml di Poly-cg (c) 100 ng/ml (d) 1 µg/ml i valori sono espressi come variazione rispetto al non trattato. L'esperimento è stato condotto in triplicato

Questi risultati suggeriscono che l'interazione tra DNA e MHC II induce l'attivazione di meccanismi intracellulari che interferiscono con i pathway infiammatori indotti da LPS down-modulando l'espressione dei geni attivati da LPS e inducendo la produzione di CCL22.

Localizzazione ed effetti del cirDNA in vivo

Gli studi precedenti hanno dimostrato l'effetto immunoregolatorio del DNA che si esercita indipendentemente dall'origine (sintetico o plasmatica) dello stesso. L'effetto regolatorio si concretizza in un'alterazione della presentazione antigenica attraverso un verosimile impedimento sterico dell'interazione tra antigene e MHC II, attraverso un signaling intracellulare inibitorio su importanti pathway infiammatori e attraverso la produzione di molecole, quali la chemochina CCL22 (nota per la sua capacità di reclutare cellule regolatorie) favorenti l'immunoregolazione. [25] Su queste basi, era importante valutare gli effetti in vivo del DNA. Ciò è stato fatto utilizzando due condizioni fisiologiche diametralmente opposte, un modello di infiammazione cronica (topi lupici BWF1) e un modello di tumore (inoculo di cellule di melanoma murino B16F10 in topi C57Bl). Nello studio è stato utilizzato DNA libero sottoforma di Poly-CG per evitare ogni effetto dovuto a d un eventuale carrier.

In condizioni patologiche quali autoimmunità o patologie tumorali il DNA circola a concentrazioni molto elevate. [2] Somministrando ai topi 10 ug di Poly-CG /topo si è preliminarmente osservato un incremento di DNA circolante tale da raggiungere concentrazioni paragonabili a quelle riscontrate in queste condizioni patologiche. (Tabella 4).

Tabella 5. cDNA concentrazioni plasmatiche .

*Concentrazioni di cDNA espresso in ng/ml.

	Prima dell'iniezione di Poly-CG	Dopo l'iniezione di Poly-CG
Topo 1	16.14*	166.39
Topo 2	16.66	275.97
Topo 3	35.91	119.57

Tabella 5. Concentrazioni plasmatiche di cDNA. La tabella mostra i valori di DNA circolante misurati prima e dopo l'inoculo di 10 ug/topo di cDNA sottoforma di Poly-CG

Al fine di analizzare gli effetti del DNA in vivo si è deciso di studiare prima la distribuzione di questa molecola nell'animale in seguito ad infusione endovena (10 ug). Per tracciare il DNA si è utilizzata una molecola di Poly-CG marcata con Cy-5.5. L'analisi è stata seguita 120 minuti dopo l'infusione con il sistema di imaging: In Vivo Imaging System (IVIS) (Perkin-Elmer, Waltham, MA). I risultati mostrano che il DNA somministrato si localizza prevalentemente in milza reni e fegato (figura 5A). Per dimostrare la localizzazione a livello cellulare, sono stati raccolti gli splenociti di questi topi trattati con la molecola fluoresce e sono stati analizzati in citometria. E' stato osservato che il DNA era prevalentemente associato ai tipi cellulari MHC II positivi appartenenti quindi alla classe delle cellule presentanti l'antigene (linfociti B e monociti).(Figura 5B)

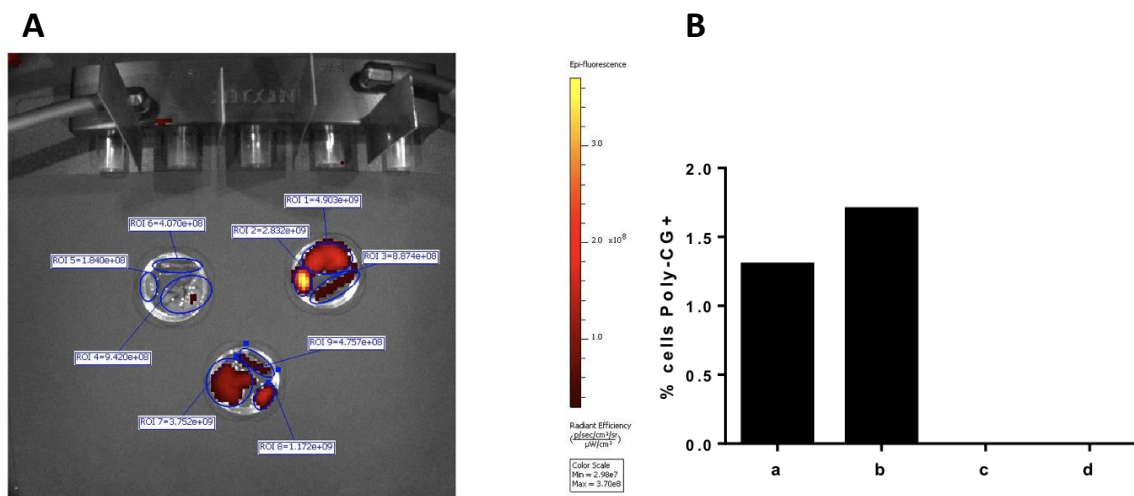


Figura 5. Il DNA si riscontra prevalentemente nelle cellule presentanti l'antigene A) Immagine acquisita in IVIS 120 minuti dopo la somministrazione di Poly-CG Cy5-5 a topi BWF1. La fluorescenza si localizza preferenzialmente in milza reni e fegato. B) analisi in citometria su splenociti di topo BWF1 trattato con PolyCG-Cy5.5. a) linfociti B; b) monociti; c) linfociti T; d) NK

Per valutare gli eventuali effetti tollerogenici del DNA circolante in una condizione di infiammazione cronica, DNA è stato somministrato per via endovenosa a topi lupici BWF1. I topi sono stati trattati settimanalmente con 10 ug/topo di PolyCG. Al raggiungimento della concentrazione di proteine nelle urine maggiore di 300mg/l (3) o in seguito a sviluppo di ascite i topi sono stati sacrificati e gli splenociti analizzati. I topi trattati con Poly-CG mostrano un incremento significativo ($p=0.05$) della popolazione T regolatorie valutata come CD4+ Foxp3+ Cd25+ . (figura 5).

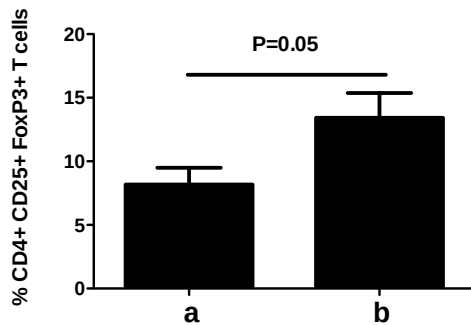
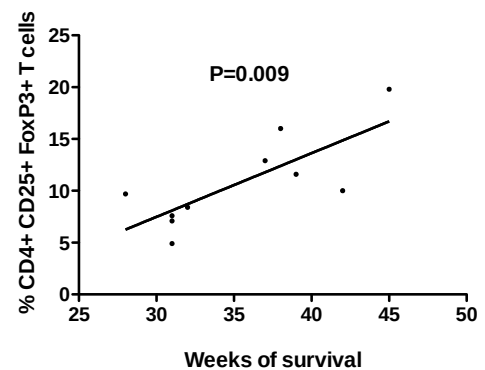
A**B**

Figura 6. La somministrazione di DNA determina un aumento di linfociti T regolatori.

A) Frequenza di linfociti CD4 regolatori tra gli splenociti di topi lupici trattati con PolyCG (a) o non trattati (b); B) correlazione tra sopravvivenza e percentuale di T regolatorie. La figura mostra la media di due esperimenti.

Sono stati valutati gli effetti delle elevate concentrazioni di DNA circolante (indotte dalla sua somministrazione) sull'andamento della patologia. I topi trattati hanno mostrato un significativo prolungamento della sopravvivenza rispetto ai non trattati ($p=0.001$). È interessante il fatto che la durata della sopravvivenza abbia mostrato una positiva correlazione con la concentrazione splenica di linfociti CD4+ Treg (Figura 6A). Negli animali trattati si è osservata una diminuzione di autoanticorpi anti dsDNA e una riduzione della proteinuria (Figura 6B), indice di una riduzione del danno renale. Per verificare se gli effetti osservati fossero dipendenti o meno dalla sequenza nucleotidica del DNA, gli esperimenti sono stati replicati con un oligonucleotide a doppio filamento costituito da 20 paia di basi di adenina e timina. (figura 6) Questo filamento di DNA ha prodotto effetti comparabili a quelli del Poly-CG indicando che l'azione immunoregolatoria del DNA non è sequenza-specifico.

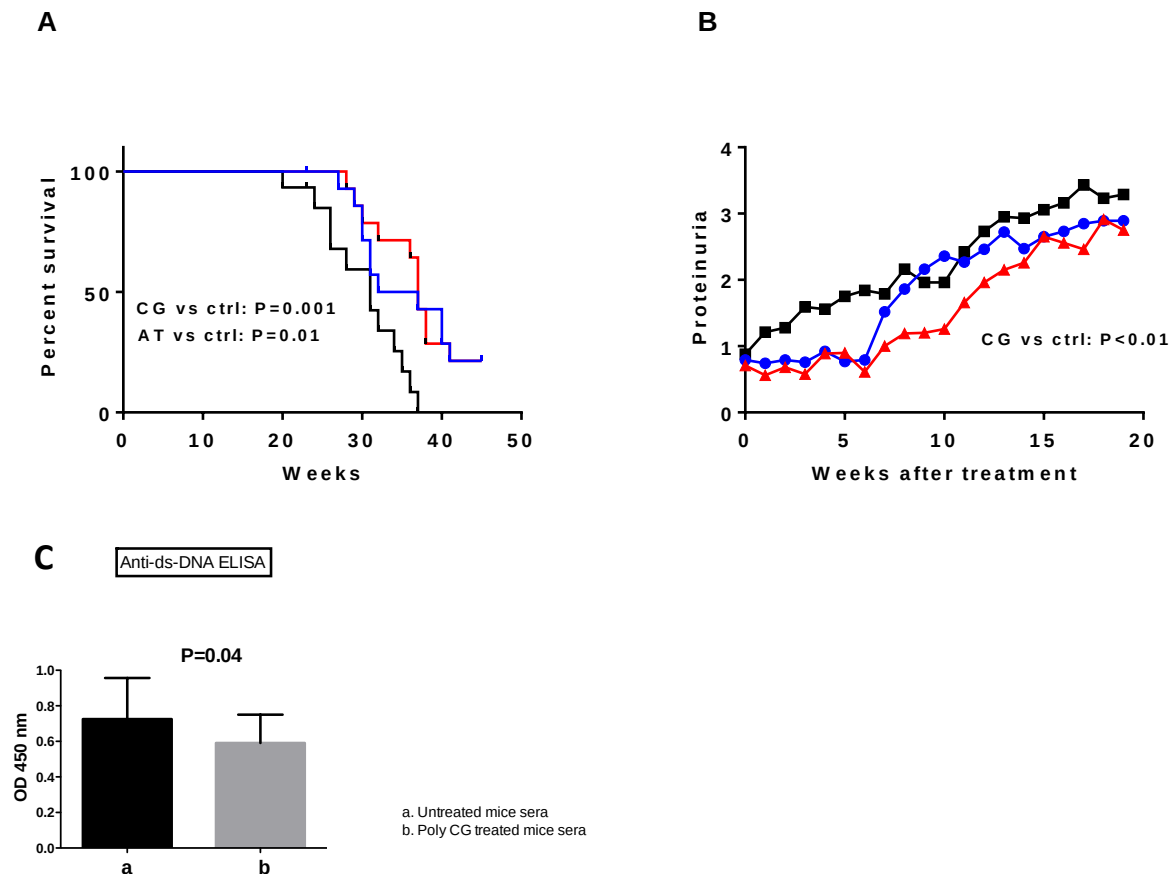


Figura 7. La somministrazione di DNA prolunga la sopravvivenza dei topi lupici e protegge dalla nefrite. Sopravvivenza (A) e proteinuria (B) dei topi lupici non trattati (linea nera), trattati con PolyCG (linea rossa) o con PolyAT (linea blu) 15 topi per gruppo. La figura mostra la media di due esperimenti. (C) concentrazione di autoanticorpi nel siero dei topi non trattati (a) e trattati con Poly CG (b).

Queste evidenze supportano il concetto che il DNA esercita un effetto regolatorio in vivo portando ad una riduzione degli effetti dovuti all'infiammazione cronica.

Al fine di supportare il concetto relativo agli effetti immunoregolatori in vivo indotti dal DNA circolante, è stato preso in considerazione un modello sperimentale antitetico a quello dell'infiammazione cronica. In tale condizione la nostra ipotesi era che il DNA circolante avrebbe dovuto indurre un peggioramento dei fenomeni di tolleranza al tumore e, quindi, una esacerbazione della malattia. Pertanto, è stato somministrato DNA sottoforma di Poly-CG a topi C57Bl pre-inoculati sottocute con cellule B16F10, una linea di melanoma murino singenico. In questi animali è stata valutata la percentuale di linfociti CD4 regolatori intrasplenici e la curva di crescita tumorale. I risultati hanno rivelato che negli animali trattati la

frequenza splenica dei linfociti T regolatori CD4+ è aumentata significativamente rispetto ai non trattati (Figura 8A). Inoltre una accelerata crescita del tumore è stata osservata nei topi trattati con DNA rispetto ai non trattati ($P \leq 0.05$) (Figura 8B). Questo suggerisce che in vivo l'effetto tollerogenico del DNA circolante contribuisce all'evasione tumorale dal controllo immunologico.

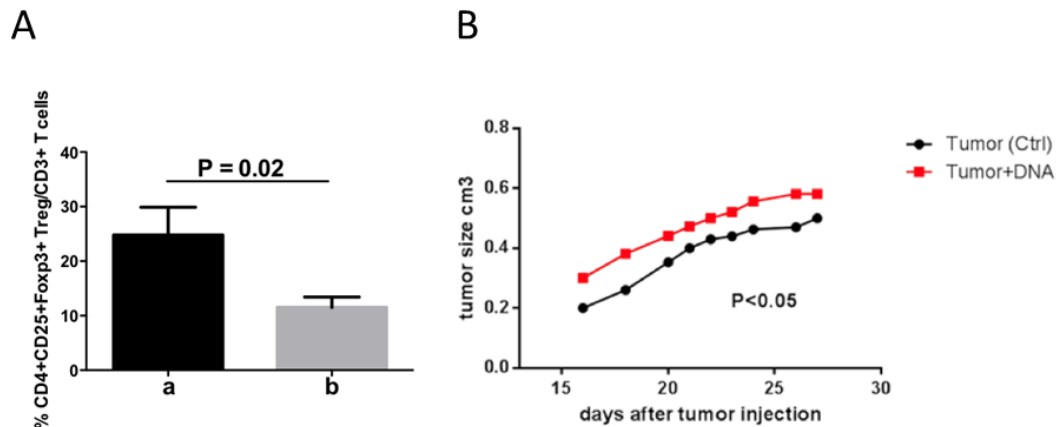


Figura 8. Variazione di linfociti T regolatori e dimensioni tumorali. **A)** Frequenza di linfociti T CD4 regolatori in splenociti di topi C57Bl con melanoma indotto attraverso somministrazione di B16F10. (a) trattati con DNA circolante (b) non trattati **B)** sviluppo tumorale in topi trattati con DNA (rosso) verso non trattati (nero). Le figure mostrano la media di valori di due esperimenti.

Materiali e metodi

Modelli murini

36 topi lupici di dodici settimane BWF1 (NZBxNZW F1) (I-Ad/u/I-Ed/u), 6 topi di otto settimane BALB/c (I-Ad/I-Ed) e 24 topi di otto settimane C57BL/6J (I-Ab/I-Enull) tutti di sesso femminile, sono stati comprati da Envigo RMS (S.Pietro al Natisone, Udine, Italia) ed ospitati in specifiche condizioni prive di patogeni nell'animal facility al IRCCS A.O.U. San Martino – IST, Genova, Italia. Tutte le procedure sono state svolte da personale qualificato della struttura secondo le linee guida fornite dal Ministero della Salute nel D.lgs 26/2014.

Linee cellulari e colture

Per valutare la variazione di espressione genica in seguito all'interazione tra MHC II e DNA è stata utilizzata una linea cellulare di macrofagi murini MHC II positiva le PMJ2-PC (ATCC® CRL2457™). Le cellule sono state coltivate in RPMI 10% FCS 5% CO₂

Per lo studio di crescita tumorale in vivo sono state utilizzate la linea B16F10 (ATCC® CRL-6475™) di melanoma murino coltivata in RPMI 10% FCS 5%CO₂ e inoculata nel topo (200.000 cellule/topo)

Pazienti oncologici

Sono stati reclutati dieci pazienti affetti da tumore prostatico metastatico (fase IV) provenienti dall'Ospedale Policlinico del San Martino (Genova, Italia) che hanno fornito un consenso informato in forma scritta. Sono stati prelevati campioni di sangue in EDTA da 5 ml da ciascun paziente. Lo studio è stato approvato dalla commissione etica locale.

Fonte e quantificazione di DNA

Come fonte di cDNA sintetico è stato utilizzato un oligonucleotide poly-CG o poly-AT di 20 bp a doppio filamento sintetizzato dalla TIB Molbiol (Genova, Italia) grazie all'annealing dei singoli filamenti di oligo dC (5'- CCC CCC CCC CCC CCC CCC CC-3') ed oligo dG (5'- GGG GGG GGG GGG GGG GGG GG-3'), nel caso dell'oligonucleotide poly-CG, o di oligo dA (5'- AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA-3') ed oligo dT (5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'), nel caso dell'oligonucleotide poly-AT. Per la generazione di un oligonucleotide poly-CG marcato con Cy5.5, sono stati utilizzati un oligo dC (5'- CCC CCC CCC CCC CCC CCC CC-3') ed un oligo dG Cy5.5 (5' Cy5.5- GGG GGG GGG GGG GGG GG-3'). La procedura di annealing è stata eseguita unendo gli oligonucleotidi (100 µM) all'annealing buffer (50 mM Tris HCl, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 1mM DTT) in una provetta e mettendo questa in acqua in ebollizione, per poi farla raffreddare a temperatura ambiente.

Come fonte naturale di cDNA è stato utilizzato quello prelevato dai campioni di plasma di pazienti affetti da tumore prostatico metastatico (fase IV), purificato per mezzo della NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel, Düren, Germany). È stata quindi eseguita una quantificazione del cDNA così ottenuto grazie al Quant-iT Picogreen dsDNA quantitation assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) su un microplate reader della Infinite F200 Pro (Tecan, Männedorf, Switzerland).

Somministrazione in vivo

Nell'esperimento condotti con topi lupici BWF1, la proteinuria è stata controllata settimanalmente usando gli strips Albustix (Siemens, Munich, Germany) e, a partire dalla ventesima settimane di età circa, al raggiungimento dei livelli di proteinuria paria a 1 (30 mg/dl), veniva quindi cominciato il trattamento di inoculo intravenoso degli oligonucleotidi poly-CG o poly-AT (10 µg in 50 µl PBS a topo) a cadenza settimanale, previo controllo della

proteinuria. I topi venivano sacrificati quando questa raggiungeva livelli >3 (>300 mg/dl) o se sviluppavano ascite. Ai topi di controllo negativo sono stati inoculati 50 μ l PBS senza il DNA.

Quantificazione ex vivo

I campioni di sangue da topi lupici BWF1 sono stati ottenuti tramite prelievo dal plesso retro-orbitale prima e dopo 10 minuti dall'inoculo intravenoso dell'oligonucleotide poly-CG (10 μ g/50 μ l PBS/topo). Il cDNA è stato quindi purificato dal plasma murino per mezzo della NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel, Düren, Germany) e quantificato grazie al Quant-iT Picogreen dsDNA quantitation assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) su un microplate reader della Infinite F200 Pro (Tecan, Männedorf, Switzerland).

Per gli esperimenti in vivo nel modello del tumore, topi C57BL/6J sono state inoculati sottocute con cellule di melanoma singeniche B16F10 (105 in 100 μ l PBS/ topo), ed è stato somministrato endovena l'oligonucleotide poly-CG (10 μ g in 50 μ l PBS/topo) a cadenza settimanale, per tre settimane a partire dal giorno in cui erano state iniettate le cellule tumorali. La crescita tumorale è stata monitorata giornalmente misurando con un calibro la larghezza e la lunghezza del tumore e calcolandone il volume secondo la formula: $W*W*L*0,5$, dove W rappresenta la larghezza, ovvero il diametro minore, e L la lunghezza, ovvero il diametro maggiore. I topi sono stati sacrificati quando il tumore raggiungeva un volume di 1 cm³. Ai topi del gruppo di controllo negativo è stato inoculato solo PBS e agli animali del gruppo di controllo positivo solo le cellule B16F10.

Localizzazione di DNA ex vivo e Citometria

I topi lupici BWF1 sono stati inoculati endovena con 10 μ g di oligonucleotide poly-CG marcato con Cy5.5 e soppressi dopo 120 minuti. Sono stati quindi prelevati gli organi ed analizzati mediante tecnologia In Vivo Imaging System Scanning (IVIS) (Perkin-Elmer, Waltham, MA). Le immagini hanno mostrato un accumulo di cDNA marcato nel fegato, nella milza e nei reni. Le

milze sono state quindi disgregate meccanicamente e fatte passare attraverso un filtro cellulare (40 μ m) per ottenere una sospensione cellulare omogenea. Successivamente alla lisi dei globuli rossi presenti (Red blood cell lysing buffer, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), gli splenociti ottenuti sono stati incubati 15 minuti a temperatura ambiente in condizioni di oscurità con i seguenti anticorpi monoclonali associati a fluorocromi: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD25, anti-CD19, anti-49b, anti-CD39, anti-CD11b, anti-CD45R e anti-FoxP3 secondo le istruzioni del produttore. Tutti gli anticorpi sono stati acquistati dalla Becton Dickinson (BD) Biosciences. Dopo alcuni lavaggi sono stati analizzati al citofluorimetro a flusso BD FACSCanto grazie al software FACS DIVA (BD) valutando la fluorescenza relativa all'oligonucleotide poly-CG marcato con Cy5.5 associata ai diversi lineage cellulari .

Per valutare la fosforilazione di plcg2 è stato utilizzato il seguente anticorpo monoclonale coniugato con ficoeritrina (PE) Mouse anti-PLC- γ 2 (pY759, Clone K86-689.37) utilizzando il protocollo del produttore. L'esperimento è stato eseguito con splenociti di topo C57bl ottenuti per disaggregazione meccanica. Le cellule sono state stimulate 3 minuti con le seguenti molecole; LAG 3 (10 μ g/ml) Poly-CG (100 ng/ml) DNA circolante (2 ng/ml). Plcg2 è stato valutato sulle cellule CD11b positive

Test di proliferazione antigene specifico

I topi BALB/c sono stati immunizzati con ovalbumina (OVA) tramite iniezione sottocutanea, ai giorni 0, 15 e 30 (Ovalbumin chicken egg grade V 60 μ g, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) emulsionata in rapporto 1:1 (vol/vol) con Complete Freund Adjuvant (CFA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). I topi iper-immunizzati nei confronti di OVA sono stati soppressi 2 settimane dopo l'ultima somministrazione dell'antigene. Sono quindi state prelevate le milze, disgregate meccanicamente e passate attraverso un filtro cellulare (40 μ m) per ottenere una sospensione cellulare omogenea. Successivamente alla lisi dei globuli rossi presenti (Red blood cell lysing buffer, Sigma Aldrich, St. Louis, MO), gli splenociti sono stati divisi in due parti . Un campione

è stato colorato con carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFDA-SE) (), mentre l'altro è stato trattato con il colorante Cell Trace (Thermo Fisher Scientific) e successivamente irradiato. L'esperimento è stato condotto in triplicato aggiungendo alternativamente per pozzetto 105 splenociti CFDA-SE+, in 200 µl di medium RPMI (Gibco-Life Technologies, Monza, MB, Italy) nelle seguenti condizioni: a) 105 splenociti colorati con Cell Trace ed irradiati; b) 105 splenociti colorati con Cell Trace ed irradiati in presenza di OVA (concentrazione finale 100 µg/ml); c) 105 splenociti colorati con Cell Trace ed irradiati in presenza di OVA e poly-CG (concentrazione finale 100 ng/ml); d) 105 splenociti colorati con Cell Trace ed irradiati in presenza di OVA e cDNA tumorale (concentrazione finale 2,5 ng/ml). Per disporre di una quantità sufficiente di cDNA tumorale per gli esperimenti di inibizione della proliferazione antigene-specifica, sono state preparate aliquote di cDNA ottenuto da plasma di pazienti con tumore, dividendoli in 3 gruppi: pazienti dal #1 al #4; dal #5 al #7 e dal #8 al #10. Culture con solo medium o con medium e concavalina A (Con A) (concentrazione finale di 2,5 µg/ml) sono stati usati rispettivamente come controlli negativo e positivo della proliferazione. La proliferazione degli splenociti è stata valutata mediante citofluorimetria determinando la riduzione di CFDA-SE (percentuale di cellule CFDA-SE dim) nelle diverse condizioni

South-westernblot

Gli splenociti dei topi lupici BWF1, esprimenti MHC di classe II (I-Ad/u/I-Ed/u), sono stati lisati usando il buffer per lisi cellulare NP-40 all'1% insieme ad un cocktail di inibitori di proteasi (G-Biosciences, St Louis, MO) ed immunoprecipitati usando un anticorpo murino anti-I-Ad (clone 39-10-8, Biolegend, San Diego, CA). Il lisato è stato quindi fatto correre su un gel di SDS-polyacrylamide (Bolt 4-12% Bis-Tris Plus polyacrylamide gel, Thermo-Fisher Scientific) in condizioni non riducenti e successivamente trasferito su una membrana di nitrocellulosa ed incubato o con un anticorpo anti-I-Ad (160 ng/ml) oppure con l'oligonucleotide poly-CG (30 ng/ml) seguito da un anticorpo murino anti-dsDNA (500 ng/ml) (Abcam, Cambridge, UK). È stato quindi aggiunto, in entrambi i casi, un anticorpo anti-Fc di IgG murino associato ad una

perossidasi (Sigma-Aldrich) (1:10000) ed il relativo substrato con lo scopo di riconoscere entrambi gli anticorpi precedentemente aggiunti ed evidenziare le bande di MHC di classe II del medesimo peso molecolare (61 kD).

Espressione genica

I macrofagi di origine peritoneale PMJ2-PC (106), derivanti da topi C57BL/6J, sono stati incubati con LPS (1µg/ml) e l'oligonucleotide poly-CG, a concentrazioni da 1ng/ml, 100 ng/ml e 1µg/ml, aggiunto dopo 21 ore insieme all'LPS per un totale di 24 ore, per valutare l'incubazione con il cDNA a 3 ore. In caso di controllo negativo non è stato aggiunto il DNA. Le cellule sono state quindi raccolte ed è stato estratto l'RNA totale usando l'Rneasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) secondo le istruzioni del produttore. La qualità dell'RNA è stata valutata nel rapporto 260/280 usando il Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Un µg di RNA di ciascuna condizione è stato retro-trascritto usando il QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) secondo le istruzioni del produttore. Entrambi i kit garantivano la completa rimozione del DNA genomico. L'espressione del gene per la chemochina CCL22 è stata analizzata tramite qPCR rispetto a quella del gene per la TATA-Box Binding Protein, usato quindi come housekeeping, e confrontata tra cellule trattate o meno con DNA. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti con il Iq5 Multicolor RealTime PCR Detection System utilizzando il 2x iQ SYBR Green Supermix e piastre da 96 pozzetti (Biorad, Hercules, CA). La temperatura di annealing è stata di 60° e la specificità della reazione è stata confermata dall'analisi delle melting curves.

Analisi di modeling molecolare

Fino ad ora, vari dati cristallografici di MHC di classe II murino sono stati ottenuti e rilasciati su banca dati di proteine, questi sono solo parzialmente in accordo con quelli considerati in questi esperimenti. In particolare, per i calcoli di modeling molecolare abbiamo selezionato le proteine cristallizzate disponibili nominate dai codici pdb 1IEB (risoluzione = 2.7 Å) [26] e 1MUJ (risoluzione = 2.15 Å) [27].

Il modello finale di MHC-II impiegato in questi studi è stato ottenuto abbinando le due proteine indicate precedentemente allo scopo di costruire una struttura tridimensionale affidabile MHC II, mediante il software MOE [MOE: Chemical Computing Group Inc. Montreal. H3A 2R7 Canada. <http://www.chemcomp.com>].

Le coordinate del complesso sono state ridotte al minimo e perfezionate con il campo di forza AMBER99. Successivamente, le regioni soggette ad aggregazione nei tre modelli sono state calcolate utilizzando il modulo Protein Patch Analyzer implementato nel software MOE. Questa applicazione viene utilizzata per generare rappresentazioni visive di patch di superficie proteiche come mezzo per predire i possibili siti inclini all'aggregazione proteica o per razionalizzare i siti di legame proteina-proteina, essendo spesso correlati alla presenza di aree di interazione idrofobiche.

Con questo obiettivo specifico, recentemente è stato proposto un metodo computazionale chiamato Spatial Aggregation Propensity (SAP), che è in grado di prevedere le propensioni all'aggregazione identificando i patch superficiali idrofobici [28].

Lo strumento Protein Patch Analyzer implementato in MOE consente di determinare le regioni di patch idrofile e idrofobiche di una proteina specificata, basata sulla superficie di interazione accessibile con solvente di Van der Waals. Tre classi di patch superficiali sono calcolate sulla base di calcoli di potenziale elettrostatico e idrofobico, consentendo la classificazione di patch idrofobiche, cariche negative e cariche positive. Il potenziale idrofobico viene calcolato applicando i parametri di Wildman e Crippen SlogP [29].

Qualsiasi patch calcolata è quindi chiaramente classificata in termini di proprietà diverse, come l'area della superficie di contatto ($\text{\AA}^2$), la superficie di contatto come percentuale della superficie totale della proteina, il massimo valore potenziale misurato all'interno del pathc (kcal / mol) e il potenziale di patch medio (kcal / mol). Inoltre, viene determinato anche il numero di atomi di ossigeno, azoto e zolfo altamente esposti alla superficie, essendo

probabilmente correlato alla presenza di residui con propensione per la deamidazione o di residui tirosina esposti alla superficie, che sono di particolare interesse a causa della loro capacità di formare specie covalenti.

In tandem con queste analisi, la possibilità di interazione tra poly-CG e il modello murino di MHC di classe II è stata esaminata in via preliminare eseguendo il modulo finder del MOE, volto a identificare le cavità proteiche più probabili per i contatti leganti.

Infine, il modo di legare putativo sottolineando i contatti chiave tra le proteine di cui sopra è stato studiato da calcoli di docking proteina-proteina, dal software MOE.

Nell'attracco delle proteine-proteine, una struttura proteica, denominata ligando, viene agganciata a un'altra, indicata come recettore. Comunemente, la struttura più piccola viene scelta come ligando, ma non è necessario che sia così. Nella modellazione degli anticorpi, l'antigene viene solitamente specificato come ligando, ma, ancora una volta, non è necessario che sia così. La finestra mobile proteina-proteina utilizza un metodo multistadio per generare pose e quindi classificarle. Partendo da un modello a grana grossa (CG) per ridurre lo spazio di ricerca computazionale, viene utilizzato un approccio FFT (Fast Fourier Transform) per esplorare in modo efficiente lo spazio di configurazione. Questo è seguito da un processo di minimizzazione che è costruito attorno a un protocollo di convergenza graduale.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software Prism 5.04 della GraphPad Software (La Jolla, CA). Per tutte le distribuzioni è stato usato il test D'Agostino e Pearson per la normalizzazione e conseguentemente sono stati applicati test parametrici o non parametrici. Per la comparazione singola, i valori di P sono stati calcolati con il test T di Student, per l'analisi della sopravvivenza, i valori di P sono stati calcolati usando il test Log-Rank (Mantel Cox). Il valore P è stato mostrato solo in caso di significatività ($\alpha=0.05$).

Discussione

I risultati di questo studio mostrano che il DNA è un ligando naturale di MHC II murino, e non soltanto di HLA II, e che, quindi, l'interazione molecolare tra DNA e molecole MHC è conservata tra specie diverse.

Il legame tra queste molecole è stato analizzato in silico ed è emerso che il DNA interagisce con MHC II attraverso un'interazione che avviene nella tasca di legame dell'antigene.

Questa interazione produce effetti regolatori sull'immunità innata e adattativa, interferisce infatti con il signaling infiammatorio indotto da LPS e con la proliferazione antigene specifica. Questo effetto in vivo è associato all'espansione/mobilitazione della popolazione T regolatoria, attraverso la produzione di CCL22 da parte delle cellule presentanti l'antigene sulle quali avviene l'interazione MHC II-DNA.

Per valutare gli effetti intracellulari indotti dall'interazione DNA-MHC II, sono stati selezionati, in piastre precustomizzate, alcuni geni comuni ai pathway infiammatori più comuni (Allegato 1). Per questi esperimenti è stata utilizzata una linea cellulare di macrofagi murini, le PMJ2-PC. Queste cellule sono state trattate con LPS e diverse concentrazioni di Poly-CG. Tra i geni analizzati i seguenti sono quelli che mostravano variazioni significative in seguito a trattamento con Poly-CG: Grb2, Mapk14, Nfkbie, Egr1. Questi geni sono stati analizzati in maniera più approfondita. Le PMJ2-PC sono quindi state trattate con LPS 1 ug/ml e diverse concentrazioni di Poly-CG. L'RNA messaggero è stato quantificato in realtime-PCR. I risultati hanno mostrato che l' LPS induce un incremento dei geni Grb2, Mapk14, Nfkbie, tutti coinvolti nel pathway del TLR4 [Kegg Pathway], e di Egr1. Il trattamento con Poly-CG a diverse concentrazioni ha indotto una riduzione dell'espressione di Grb2, Mapk14, Nfkbie. Questo indica che l'attività del DNA è in grado di contrastare gli effetti infiammatori dell' LPS. (Tabella 4 e figura 10)

Il Pathway attivato dal DNA sulle APC deve ancora essere delineato nel dettaglio. Ad oggi è noto che il legame tra HLA-DR con ligandi bivalenti induce una rapida fosforilazione in tirosina su molti substrati tra i quali Lyn, e l'attivazione di MAPK ERK ½. [30]

Durante la formazione della sinapsi immunologica tra TCR e corecettori e MHC II, la trasduzione del segnale avviene in entrambe le cellule coinvolte[30]. Nei linfociti T le proteine LAT (adattatori transmembrana associati ai raft lipidici) svolgono un ruolo fondamentale, tra queste SCIMP è una proteina adattatrice transmembrana recentemente identificata, espressa sui linfociti B e altre cellule presentanti l'antigene. Questa proteina si localizza nella sinapsi immunologica. Nei linfociti B è associata ad alcune chinasi tra cui Lyn, e viene fosforilata in seguito alla stimolazione di MHC II. Quando viene fosforilata, SCIMP recluta Grb2 e SLP65 innescando un signaling, il legame con csk produce un loop inibitorio. Quindi SCIMP funziona come regolatore della presentazione antigenica (Figura 9). [31].

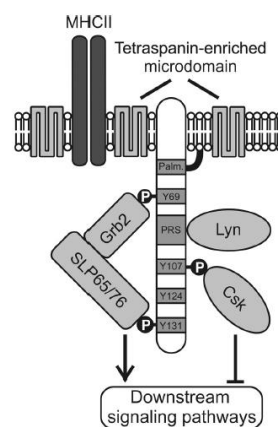


Figura 9. Modello di trasduzione del segnale mediata da SCIMP[31] SCIMP è localizzato in un microdominio arricchito in tetraspanina ed è associato a MHC II. Attraverso una sequenza ricca di prolina (PRS), SCIMP lega costitutivamente il dominio SH3 della chinasi Lyn. Attraverso il cross linking nella sinapsi immunologica SCIMP viene fosforilato (P) in diversi residui di tirosina e recluta un complesso di Grb2 e SLP65 o SLP75 sulla membrana plasmatica. SLP 65 o SLP76 iniziano una cascata del segnale che attiva pathway a valle. Questo processo è controllato da un regolatore negativo della chinasi Csk, che viene reclutata inoltre da SCIMP fosforilato[25].

GRB2 è una proteina adattatrice che viene fosforilata in tirosina e svolge un ruolo nella trasduzione del segnale agendo come proteina adattatrice attraverso SH2 e SH3 (Src homology). Grb2 induce attivazione di RAS e partecipa quindi alla cascata del segnale delle MAPK [32, 33]. Questo segnale è presente anche sulle cellule presentanti l'antigene e induce la trascrizione di geni pro-infiammatori attraverso AP1. [34] I nostri dati hanno mostrato che l'interazione tra DNA e MHC II induce una riduzione del trascritto di grb2 e di p38, influenzando entrambi gli effetti di AP-1 a valle del signaling infiammatorio del TLR4.

SCIMP è un adattatore di proteine di membrana (TRAP) che promuove la produzione di citochine infiammatorie attraverso la modulazione del TLR4. Nei macrofagi SCIMP è strettamente associato a Lyn ed è necessario per la fosforilazione di TLR 4, facilitando la produzione di citochine infiammatorie. Il cross linking di MHC II induce la fosforilazione di SCIMP in tirosina che ne permette l'interazione con TLR4 inducendo infiammazione. [35]

Il legame tra MHC II con il DNA impedisce il signaling infiammatorio di TLR4 e MHC II attraverso la riduzione di Grb2 che altera la funzionalità di SCIMP e impedisce la normale attivazione dei signaling infiammatori.

Tuttavia sono diversi i meccanismi molecolari coinvolti nello spegnimento dell'infiammazione dovuti agli effetti del cDNA. I risultati ottenuti mostrano un coinvolgimento di diverse molecole tra cui anche MAPK 14 (p38). Tra i geni quantificati anche EGR1 risulta variare in maniera significativa. Rimane da definire quindi in che modo EGR1 possa essere coinvolto nel meccanismo di tolleranza.

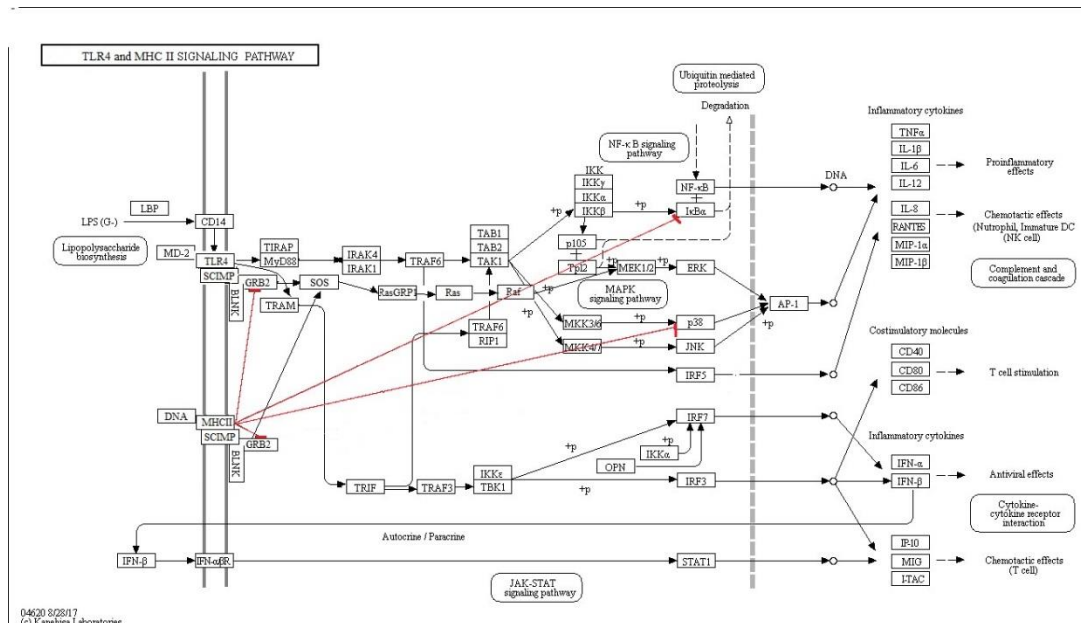


Figura 10. Signaling pathway di TLR4 in presenza di Poly-CG DNA. Il Pathway mostra il segnale di TLR4. L'interazione tra DNA e MHC II inibisce la trascrizione di GRB2, p38 (MAPK14) e ikba inibendo quindi la cascata del segnale a valle.

Al fine di conciliare gli effetti regolatori mediati dal DNA con la ben documentata esistenza di sensori del DNA pro-infiammatori, dobbiamo considerare i nostri risultati nel contesto delle attuali conoscenze. Noi suggeriamo uno scenario in cui il cDNA, che fisiologicamente origina dalla morte cellulare autologa e deve essere tollerato, interagisce principalmente con ligandi (come le molecole MHC di classe II) presenti sulla superficie cellulare dell'APC inducendo segnali prevalentemente tollerogenici; al contrario il DNA derivato da agenti patogeni, che è veicolato direttamente all'interno dei compartimenti intracellulari dall'agente infettivo, si lega ai sensori del DNA intracellulare e induce infiammazione.

Le prove per l'attività di regolazione immunitaria in vivo da parte del cDNA provengono anche dalla sua capacità di modulare in modo differenziale l'esito di due modelli sperimentali antitetici di malattia, uno costituito da topi prone allo sviluppo di SLE e l'altro da un melanoma sperimentale aggressivo. Per quanto riguarda il SLE, tra le varie alterazioni immunologiche riscontrate in tale malattia la compromissione dei circuiti regolatori è stata proposta come una fase iniziale nella cascata patogenetica. In particolare, sono state segnalate alterazioni quantitative e qualitative dei linfociti T regolatori (Treg) [36, 37]. Sulla base di questa

conoscenza, è di particolare interesse che l'effetto protettivo in vivo di maggiori concentrazioni di cDNA sia stato associato all'espansione di Treg.

Per quanto riguarda il modello del tumore, la nostra osservazione che l'aumento delle concentrazioni di cDNA favorisca la crescita del tumore è interessante, e potrebbe fornire una interpretazione meccanicistica alla correlazione inversa osservata tra le concentrazioni di cDNA nei pazienti oncologici e la sopravvivenza [5, 38, 39]. È probabile che questa attività di promozione possa derivare dai molteplici effetti del signaling intracellulare dipendente dal DNA. In effetti, questo signaling interessa sia geni che controllano le risposte immunologiche (come espansione / reclutamento dei Treg attraverso la down-regulation di MAPK14 e up-regulation di CCL22) sia geni direttamente coinvolti nello sviluppo del tumore quale GRB2, che è noto come fattore pro-tumorigenico [40]

Collettivamente, il nostro studio delinea una nuova funzione di regolazione immunitaria per il cDNA che non è legata alle sue proprietà genetiche ma dipende dalla sua interazione con specifici recettori immunitari come le molecole di MHC classe II.

Bibliografia

1. P., M.P.M., *Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme..* C R Seances Soc Biol Fil., 1948. **142**(241): p. 3-4.
2. van der Vaart, M. and P.J. Pretorius, *Circulating DNA. Its origin and fluctuation.* Ann N Y Acad Sci, 2008. **1137**: p. 18-26.
3. Leon, S.A., et al., *Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy.* Cancer Res, 1977. **37**(3): p. 646-50.
4. Zhang, S., et al., *Elevated Plasma cfDNA May be Associated with Active Lupus Nephritis and Partially Attributed to Abnormal Regulation of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Patients with Systemic Lupus Erythematosus.* Internal Medicine, 2014. **53**(24): p. 2763-2771.
5. Cheng, J., et al., *Circulating free DNA integrity and concentration as independent prognostic markers in metastatic breast cancer.* Breast Cancer Research and Treatment, 2018. **169**(1): p. 69-82.
6. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family.* Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
7. Lemos, H., et al., *Cytosolic DNA sensing via the stimulator of interferon genes adaptor: Yin and Yang of immune responses to DNA.* Eur J Immunol, 2014. **44**(10): p. 2847-53.
8. Hiroaki Hemmi, O.T., Taro Kawai, *A toll like receptor recognise bacterial DNA.*
9. Paludan, S.R. and A.G. Bowie, *Immune sensing of DNA.* Immunity, 2013. **38**(5): p. 870-80.
10. Abe, T., et al., *STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense.* Mol Cell, 2013. **50**(1): p. 5-15.
11. Unterholzner, L., *The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors?* Immunobiology, 2013. **218**(11): p. 1312-21.

12. Burdette, D.L., et al., *STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP*. Nature, 2011. **478**(7370): p. 515-8.
13. Woodward, J.J., A.T. Iavarone, and D.A. Portnoy, *c-di-AMP secreted by intracellular Listeria monocytogenes activates a host type I interferon response*. Science, 2010. **328**(5986): p. 1703-5.
14. Takayuki Abe, G.N.B., *Cytosolic-DNA-Mediated, STING-Dependent Proinflammatory Gene Induction Necessitates Canonical NF- κ B Activation through TBK1*.
15. Nickerson, K.M., et al., *TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus*. J Immunol, 2010. **184**(4): p. 1840-8.
16. Archer, K.A., J. Durack, and D.A. Portnoy, *STING-dependent type I IFN production inhibits cell-mediated immunity to Listeria monocytogenes*. PLoS Pathog, 2014. **10**(1): p. e1003861.
17. Lemos, H., et al., *STING Promotes the Growth of Tumors Characterized by Low Antigenicity via IDO Activation*. Cancer Res, 2016. **76**(8): p. 2076-81.
18. Lemos, H., et al., *STING, nanoparticles, autoimmune disease and cancer: a novel paradigm for immunotherapy?* Expert Rev Clin Immunol, 2015. **11**(1): p. 155-65.
19. Huang, L., et al., *Engineering DNA nanoparticles as immunomodulatory reagents that activate regulatory T cells*. J Immunol, 2012. **188**(10): p. 4913-20.
20. E.Y. Rykova, P.P.L., and V.V. Vlassov, *Circulating Nucleic Acids in Health and Disease*.
21. Filaci et al., *Double-stranded deoxyribonucleic acid binds to HLA class II molecules and inhibits HLA class II-mediated antigen presentation*. European journal of immunology, 1998.
22. *Apoptotic DNA Binds to HLA Class II Molecules Inhibiting Antigen Presentation and Participating in the Development of Anti-Inflammatory Functional Behavior of Phagocytic Macrophages* Gilberto Filaci et al. Human Immunology 64, 9–20 (2003)

23. Benlloch, S., et al., *Cell-free DNA concentration in pleural fluid and serum: quantitative approach and potential prognostic factor in patients with cancer and pleural effusions*. Clin Lung Cancer, 2006. **8**(2): p. 140-5.
24. Cichero, E., et al., *Insights into the structure and pharmacology of the human trace amine-associated receptor 1 (hTAAR1): homology modelling and docking studies*. Chem Biol Drug Des, 2013. **81**(4): p. 509-16.
25. Qin, X.J., et al., *CCL22 recruits CD4-positive CD25-positive regulatory T cells into malignant pleural effusion*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(7): p. 2231-7.
26. Daved H. Fremont, W.A.H., Philippa Marrack, and J. Kappler, *Structure of an MHC class II molecule covalently bound single peptides*. SCIENCE • • **VOL. 272**(17 MAY 1996).
27. , A.Y.R., et al., *Crystal Structure Of MHC Class II I-Ab in Complex with a Human CLIP Peptide: Prediction of an I-Ab Peptidebinding Motif*Yuerong Zhu1 4*. J. Mol. Biol., (2003) **326**, 1157-1174.
28. Chennamsetty, N., Voynov, V., Kayser, V., Helk, Trout, B.L.; Design of therapeutic proteins with enhanced stability; *PNAS* 29 (**2009**) 11937–11942
29. Wildman, S.A. and G.M. Crippen, *Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions*. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 1999. **39**(5): p. 868-873.
30. marlene Bouillon‡, Y.E.F., Julie Girouard‡, Hayssam Khalil§¶, and a.W.M. Jacques Thibodeau§ • , *Lipid Raft-dependent and -independent Signaling throughHLA-DR Molecules*. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2003(Vol. 278, No. 9, Issue of February 28, pp. 7099–7107, 2003).
31. Peter Draber, I.V., 1 Ondrej Stepanek,1 Matous Hrdinka,1 Marketa Kucova,1, P.O. Tereza Skopcova, 1 Pavla Angelisova,1 Vaclav Horejsi,1 Mandy Yeung,2, and a.T.B. Arthur Weiss, *SCIMP, a Transmembrane Adaptor Protein Involved in*

32. Xu, S., et al., *Interactions between the Ig-Superfamily Proteins DIP-alpha and Dpr6/10 Regulate Assembly of Neural Circuits*. Neuron, 2018. **100**(6): p. 1369-1384 e6.
33. Li, S., et al., *Tyrosine phosphorylation of Grb2 by Bcr/Abl and epidermal growth factor receptor: a novel regulatory mechanism for tyrosine kinase signaling*. EMBO J, 2001. **20**(23): p. 6793-804.
34. Malak Haidar¹, Jessie Whitworth^{1,2}, Gaelle No  ^{3,4}, Wang Qing Liu^{3,4}, Michel Vidal^{3,4} & and S.R. Gordon Langsley¹, *TGF-  2 induces Grb2 to recruit PI3-K to TGF-RII that activates JNK/AP-1-signaling and augments invasiveness of Theileria transformed macrophages*. Nature Scientific Reports.
35. Lin Luo^{1, *}, Nilesh J. Bokil^{1,2, *}, Adam A. Wall^{1,2}, Ronan Kapetanovic^{1,2}, Natalie M. Lansdaal¹, et al., *SCIMP is a transmembrane non-TIR TLR adaptor that promotes proinflammatory cytokine production from macrophages*. nature communication, Received 29 Oct 2015 | Accepted 2 Dec 2016 | Published 18 Jan 2017.
36. Mudd, P.A., B.N. Teague, and A.D. Farris, *Regulatory T cells and systemic lupus erythematosus*. Scand J Immunol, 2006. **64**(3): p. 211-8.
37. Filaci, G., et al., *Impairment of CD8+ T Suppressor Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus*. The Journal of Immunology, 2001. **166**(10): p. 6452-6457.
38. S. Valpione a, b., G. Gremel a, P. Mundra a, P. Middlehurst a, E. Galvani a,, R.J.L.a. M.R. Girotti a, G. Garner a, N. Dhomen a, P.C. Lorigan b,, and R. Marais a, *Plasma total cell-free DNA (cfDNA) is a surrogate biomarker for tumour burden and a prognostic biomarker for survival in metastatic melanoma patients*. European Journal of Cancer 88 (2018) 1e9, 2017.

39. breast, C.D.a.b.i. and cancer, *Circulating DNA as biomarker in breastcancer*.
40. Alessio Giubellino¹, T.R.B.J., and Donald P. Bottaro, *Grb2 Signaling in Cell Motility and Cancer*. 2008.

Allegati

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Ikbkb	Calm3	Orai1	Pik3cb	Ppp3ca	Tbp	Ikbkb	Calm3	Orai1	Pik3cb	Ppp3ca	Tbp	A
B	Ikbkg	Nfata1	Hras1	Pik3cd	Egr2	Gapdh	Ikbkg	Nfata1	Hras1	Pik3cd	Egr2	Gapdh	B
C	Nfkbia	Nfata2	Lyn	Pik3r1	Egr3	Hprt	Nfkbia	Nfata2	Lyn	Pik3r1	Egr3	Hprt	C
D	Nfkbib	Nfata3	Mapk1	Plog1	Mapk8	gDNA	Nfkbib	Nfata3	Mapk1	Plog1	Mapk8	gDNA	D
E	Nfkbie	Gsk3a	Mapk3	Plog2	Mapk14	PCR	Nfkbie	Gsk3a	Mapk3	Plog2	Mapk14	PCR	E
F	Raf1	Gsk3b	Nfkb1	Jun	Sos2	RQ1	Raf1	Gsk3b	Nfkb1	Jun	Sos2	RQ1	F
G	Calm1	Egr1	Nfkb2	Ptgs2	Sos1	RQ2	Calm1	Egr1	Nfkb2	Ptgs2	Sos1	RQ2	G
H	Calm2	Grb2	Pik3ca	Stim1	Syk	RT	Calm2	Grb2	Pik3ca	Stim1	Syk	RT	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	