



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E

SPERIMENTALI

CICLO XXIII

TITOLO DELLA TESI:

L'Efferocitosi Difettiva Dei Fagociti Presenti nelle Lesioni Aterosclerotiche

Avanzate Dipende dal Clivaggio del Recettore Mertk da parte della

Metalloproteinasi ADAM17

Dottorando: Dott.ssa Stefania Manfro

Tutor: Dott.ssa Anna Fratta Pasini

INTRODUZIONE	3
SCOPO DELLO STUDIO	8
Scopo dello studio	9
MATERIALI E METODI.....	10
Selezione delle placche carotidee umane	11
Preparazione delle placche carotidee umane	11
Analisi istologica.....	12
Analisi immunohistochimica	12
Analisi densitometrica dell'immagine di immunohistochimica	13
Analisi di presenza di apoptosi	13
Estrazione RNA totale contenuto nelle placche e nelle cellule THP-1	14
Real-Time PCR.....	15
Preparazione del PE	15
Colture cellulari	15
Trasfezione e silenziamento	16
Citofluorimetria	16
Western Blotting	17
Altre analisi	18
Analisi statistica	18
RISULTATI	19
Localizzazione delle cellule apoptotiche nelle placche carotidee umane.....	20
Espressione (mRNA e proteina) dei fattori correlati all'apoptosi, recettori TAM, GAS6 e ADAM17 nelle placche carotidee umane.....	20
Localizzazione immunohistochimica delle proteine ADAM17 e Mertk	20
Effetto del PE sull'espressione (mRNA e proteine) dei fattori correlati all'apoptosi, dei recettori TAM, GAS6 e ADAM17 nelle cellule THP-1.....	21
Effetto tempo-dipendente del PE sul dominio extracellulare di Mertk e su ADAM17 nelle cellule THP-1	21
sMer modula la concentrazione di GAS6 nel medium delle cellule THP-1 stimulate con PE	22
TABELLE E FIGURE	23
DISCUSSIONE	41
BIBLIOGRAFIA	45

INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio è apparso via via più evidente come la rottura di una placca aterosclerotica instabile sia il fisiopatologico substrato degli eventi cardiovascolari e cerebrovascolari acuti come l'infarto e l'ictus (1, 2, 3). L'accumulo e l'ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL ossidate, oxLDL) nello spazio sottoendoteliale è un fondamentale evento chiave nelle fasi iniziali dell'aterosclerosi che induce numerose risposte cellulari, tra le quali l'attivazione delle cellule endoteliali, l'infiltrazione dei monociti e la migrazione delle cellule muscolari lisce dalla media all'intima (4). I monociti si differenziano in macrofagi nello spazio sottoendoteliale e iniziano ad accumulare grandi quantità di oxLDL (foam cells) determinando la formazione delle placche aterosclerotiche che presentano un core lipidico ricoperto da un cappuccio fibroso di cellule muscolari lisce. La progressione dell'aterosclerosi porta alla formazione di placche complesse, ad elevato rischio di rottura, le cosiddette placche instabili che sono caratterizzate da un cappuccio fibroso sottile, infiltrazione di macrofagi, grande core lipidico, indipendentemente dal grado di stenosi (1).

Nelle placche in fase avanzata la morte dei macrofagi e delle cellule muscolari lisce avviene attraverso l'apoptosi e la necrosi (5). Recenti studi suggeriscono come l'apoptosi sia significativamente aumentata nei punti di rottura della placca nei pazienti con sindrome coronarica acuta e nelle placche instabili confrontate con le placche stabili (6, 7). Al contrario della necrosi che è una morte cellulare determinata da eventi "acuti", l'apoptosi è un processo di morte programmata ordinato e geneticamente regolato, che richiede consumo di ATP ed è essenziale per il normale sviluppo ed omeostasi dei tessuti adulti (8). Le cellule apoptotiche subiscono delle modificazioni morfologiche individuabili mediante microscopia elettronica che iniziano con la contrazione della membrana cellulare, la condensazione del citoplasma e della cromatina con frammentazione del DNA, l'esternalizzazione della fosfatidilserina (segnale "eat me") e la formazione di corpi apoptotici che vengono rimossi rapidamente dal tessuto senza indurre alcuna risposta infiammatoria (8, 9). Un ruolo importante nel processo dell'apoptosi è svolto dall'attivazione a cascata di specifici enzimi, le caspasi, ossia proteasi citoplasmatiche responsabili del clivaggio di proteine specifiche a livello dei residui di aspartato (9). Tale

attivazione è mediata da due differenti vie di segnale, la via estrinseca o recettoriale e la via intrinseca o mitocondriale (Figura 1).

L'induzione dell'apoptosi attraverso la via estrinseca vede il coinvolgimento dei cosiddetti "recettori di morte", in particolare della proteina di superficie Fas appartenente alla superfamiglia dei recettori del TNF (come il tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9, TNFRSF-9) (9). Il legame con il suo specifico ligando, FasL, determina il reclutamento del dominio di morte di Fas (FADD) e di proteine citoplasmatiche, l'oligomerizzazione del recettore stesso seguito dall'attivazione delle caspasi iniziatrici 8 e 10. Il clivaggio di questi enzimi induce l'attivazione delle caspasi effettrici (3, 6 e 7) portando alla morte cellulare (9).

Le due vie apoptotiche sono strettamente correlate e dipendenti l'una dall'altra: l'attivazione della via estrinseca, e quindi della caspasi 8, porta al clivaggio della proteina pro-apoptotica BID, dando origine alla forma tronca tBID, che permette la traslocazione all'interno dei mitocondri dei fattori appartenenti alla famiglia delle Bcl2, un gruppo di proteine localizzate sulle membrane esterne dei mitocondri, del nucleo e del reticolo endoplasmatico (10). tBID agisce sulla proteina pro-apoptotica Bax inducendone l'oligomerizzazione e quindi l'interazione con la proteina anti-apoptotica Bcl2. Gli oligomeri così formati formano dei pori sulla membrana esterna del mitocondrio, alterando il potenziale di membrana, e quindi aumentando la permeabilità e il conseguente rilascio del citocromo c. Il legame del citocromo c alla proteina Apaf1 (Apoptotic protease activating factor 1) e alla procaspasi 9 porta alla formazione di un complesso (apoptosoma) e quindi alla successiva attivazione della cascata delle caspasi (3, 6 e 7) (9). Tra le proteine anti-apoptotiche sono presenti nel citoplasma anche le XIAPs, proteine che inibiscono l'apoptosi bloccando l'attivazione delle caspasi. Al contrario elevati livelli di attivazione dell'oncosoppressore p53, determinati da danni del DNA, favoriscono l'attivazione delle proteine pro-apoptotiche (11).

In condizioni fisiologiche, le cellule apoptotiche sono rapidamente riconosciute ed internalizzate da macrofagi specializzati (fagociti o efferociti) attraverso un processo definito

fagocitosi o efferocitosi (12) (Figura 2 A). Nell'aterosclerosi in fase iniziale la rimozione delle cellule apoptotiche è molto efficiente e vantaggiosa (12), in quanto una rapida clearance porta ad una soppressione della risposta proinfiammatoria con conseguente riduzione della componente cellulare delle placche e delle dimensioni della lesione stessa (6). Nelle placche in fase avanzata, invece, le cellule apoptotiche non vengono efficientemente rimosse dagli efferociti, si accumulano e vanno incontro a morte cellulare (6). Questo processo che è definito postapoptosi o necrosi secondaria, promuove il rilascio di "detriti" proinfiammatori, che determinano l'aumento delle dimensioni del core lipidico e quindi l'instabilità della placca aterosclerotica (6).

E' stato suggerito in modelli animali che l'espansione del core lipidico sia la conseguenza di un'accelerata apoptosi macrofagica accoppiata ad una clearance fagocitica difettiva, un processo definito efferocitosi difettiva (12, 13) (Figura 2 B). Poiché in condizioni fisiologiche le cellule apoptotiche vengono rapidamente rimosse, l'evidenza di cellule apoptotiche in un tessuto è considerata indice di efferocitosi difettiva (6, 14).

Il meccanismo dell'efferocitosi non è ancora oggi completamente noto, anche se recenti evidenze in modelli animali suggeriscono come l'evento iniziale sia il riconoscimento di segnali "eat me" (15), caratterizzati dall'esposizione della fosfatidilserina sulle membrane delle cellule apoptotiche permettendo l'internalizzazione e la rimozione delle cellule apoptotiche da parte dei fagociti (15) (Figura 2 A).

Tra i recettori coinvolti nell'efferocitosi i 3 recettori appartenenti alla famiglia TAM: Tyro3, Axl e Mer tirosinchinasi (Mertk) sembrano essere i principali implicati nel processo di riconoscimento (16). Infatti è stato suggerito che la soppressione del gene per il recettore Mertk possa determinare un'efferocitosi difettiva in topi knockout per Mertk (17).

Il principale ligando di questi recettori TAM è il growth arrest-specific gene 6 (GAS6) un membro della famiglia vitamina-K dipendente espresso dalle cellule endoteliali, dalle cellule muscolari lisce e soprattutto nelle zone ricche di macrofagi nelle placche aterosclerotiche. (18). Attraverso la sua porzione N-terminale, GAS6 lega la fosfatidilserina esposta sulla

superficie delle cellule apoptotiche, agendo quindi da molecola ponte tra efferocita e cellula apoptotica (19). La dimostrazione che la soppressione del gene per GAS6 stabilizza la placca in modello sperimentale di aterosclerosi, ne suggerisce l'importanza nell'instabilità delle placche aterosclerotiche (20).

Mertk è il recettore per le cellule apoptotiche maggiormente espresso nei macrofagi efferociti (19). Recenti studi in modelli animali hanno evidenziato come questo recettore venga clivato della sua porzione extracellulare dall'azione di specifiche proteasi, con formazione della proteina solubile s-Mer (21). La proteasi maggiormente responsabile del clivaggio del dominio extracellulare di Mertk è la metallopeptidasi dominio 17 (ADAM17) che appartiene alla famiglia delle mammalian adamalysins metalloproteinasi (ADAMs), inizialmente caratterizzata come tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) (22). E' stato dimostrato in colture cellulari che la proteina sMer, derivante dal taglio proteolitico di Mertk, compete con GAS6 per il legame con Mertk determinando efferocitosi difettiva (21). La recente dimostrazione di questa competizione di s-Mer per la proteina ponte GAS6 anche in modelli animali di aterosclerosi supporta l'ipotesi di un importante ruolo causale del sequestro di GAS6 nell'efferocitosi difettiva (14).

SCOPO DELLO STUDIO

Scopo dello studio

Sulla base dei risultati precedentemente ottenuti in culture cellulari ed in modelli animali, l'obiettivo di questo studio è quello di dimostrare se l'efferocitosi difettiva presente nel core lipidico delle placche carotidee umane possa dipendere, in parte, dal clivaggio della porzione extracellulare del recettore Mertk da parte di ADAM17.

A questo scopo abbiamo effettuato:

- 1) uno studio *ex vivo* per valutare la relazione tra apoptosi e proteine Mertk ed ADAM17, confrontando diversi segmenti nelle stesse placche carotidee umane, ed in particolare, la zona circostante il core lipidico (LC) e la periferia (P);
- 2) uno studio *in vitro* per valutare l'effetto della stimolazione con estratto di placche (PE) sull'espressione (mRNA e proteica) di Mertk ed ADAM17 in cellule macrophage-like (THP-1). A tale scopo sono stati utilizzati PE provenienti dalle stesse zone dove era stata valutata l'espressione Mertk e ADAM17.

MATERIALI E METODI

Selezione delle placche carotidee umane

Sono state oggetto del presente studio 97 placche carotidee provenienti da 107 pazienti sottoposti consecutivamente ad intervento di trombo-endo-arterectomia (TEA) carotidea.

Le indicazioni all'intervento chirurgico osservate sono state mutuare da quelle raccomandate nelle linee guida della SICVE (Società Italiana di Chirurgia Vascolare ed Endovascolare) e precisamente:

- l'endoarterectomia carotidea è indicata nella stenosi sintomatica uguale o maggiore del 70% NASCET (23, 24). L'endoarterectomia carotidea è indicata nella stenosi sintomatica compresa fra il 50% ed il 69% NASCET per i pazienti a più alto rischio (ischemia recente, sintomi cerebrali, placca ulcerata, età avanzata, sesso maschile, non diabetici);
- l'endoarterectomia carotidea non è indicata nella stenosi sintomatica inferiore al 50% NASCET;
- l'endoarterectomia carotidea è indicata nella stenosi asintomatica uguale o maggiore del 60% NASCET solo se il rischio perioperatorio (1 mese dall'intervento) di complicanze gravi è almeno inferiore al 3%.

Sono stati quindi indirizzati alla chirurgia pazienti portatori di stenosi > 60% (NASCET od equivalente ECST (25) /AREA) e pazienti > 50% (NASCET od equivalente ECST/AREA) solo se sintomatici con placca ulcerata.

Preparazione delle placche carotidee umane

Tutti i 97 campioni di placca carotidea sono stati immediatamente posti nella soluzione stabilizzante RNALater (Qiagen, Hilden, Germania). Successivamente ogni placca è stata esaminata macroscopicamente, individuato il punto di massimo diametro e quindi tagliata trasversalmente in 2 metà. Da queste 2 parti principali sono stati prelevati campioni attorno al LC e nella zona P per l'esecuzione dell'esame istologico e di immunohistochimica e per l'espressione genica e proteica.

Analisi istologica

Ogni campione di placca è stato fissato in paraformaldeide 4% per 2-4 h, disidratato in alcol a concentrazioni decrescenti (100%, 95% e 80%), immerso in soluzione decalcificante con Osteodec (Bio-Optica SpA, Milano, Italia) ed incluso in paraffina. Il pezzo è stato poi tagliato mediante microtomo in sezioni di 5-15 μm e tre fette per pezzo sono state colorate con ematossilina-eosina per analisi istologica. Le placche carotidee sono state classificate istologicamente usando un sistema proposto da Virmani et al. (26) e da Stary (27). Brevemente, l'ispessimento patologico dell'intima è definito come una lesione contenente cellule muscolari lisce e lipidi extracellulari, priva di core lipidico. Placche con cappuccio fibroso sono lesioni con un piccolo core lipidico a cui si sovrappone un cappuccio fibroso con spessore $>200 \mu\text{m}$. Placche con un sottile cappuccio fibroso, sono quelle lesioni nelle quali il sottostante core lipidico è rivestito da un cappuccio fibroso sempre $<200 \mu\text{m}$. Placche ulcerate sono fibroateromi che presentano una fissurazione del cappuccio fibroso ed un sottostante core lipidico.

In questo studio abbiamo deciso di considerare per la valutazione istologica placche con cappuccio fibroso sottile ($<200 \mu\text{m}$), un'abbondante infiltrazione di macrofagi ed un sottostante core lipidico. Per ogni placca sono stati valutati i seguenti parametri:

- dimensioni del core lipidico
- spessore del cappuccio fibroso
- presenza di calcificazioni,
- fissurazione/rottura della placca
- presenza di macrofagi (Tabella 1).

Analisi immunoistochimica

Le sezioni successive a quelle utilizzate per l'analisi istologica sono state sottoposte ad analisi immunoistochimica con l'utilizzo di anticorpi primari e secondari. In particolare, le sezioni sono

state de-paraffinate, reidratate e sottoposte a smascheramento antigenico mediante buffer di sodio citrato 10 mM pH 6.0, per 5 minuti in microonde. L'attività della perossidasi endogena è stata bloccata mediante incubazione con 3% H₂O₂ in metanolo per 30 minuti. Le sezioni sono state successivamente incubate con 2% siero normale, 0,3% TritonX100 e 1% BSA per 30 minuti e poi con i seguenti anticorpi primari per 1 h a temperatura ambiente: CD68 (clone PG-M1, 1:30, Dako A/S, Germania), Mertk (Y323, 1:400, ab52968, Abcam Ltd, Cambridge, Gran Bretagna) e ADAM17 (1:300, ab57484, Abcam Ltd, Cambridge, Gran Bretagna). Successivamente sono state incubate con un anticorpo secondario complementare per 1 h a temperatura ambiente, e poi con avidina-biotina per 30 minuti per amplificare il segnale. E' stato usato come cromogeno la Diaminobenzidina (DAB) e le sezioni sono state contrastate con ematossilina. La positività per CD68, Mertk ed ADAM17 è visibile in colore marrone. In ciascun vetrino è stato eseguito anche il controllo negativo; tutte le immagini sono state valutate tramite software Image-Pro Plus del microscopio Olympus BX60 (Media Cybernetics Inc., Bethesda, USA).

Analisi densitometrica dell'immagine di immunoistochimica

L'analisi densitometrica delle proteine Mertk ed ADAM17 è stata ottenuta tramite Axio Vision 4.6 (Carl Zeiss SpA, Milano, Italia). Dopo l'analisi immunoistochimica, ciascuna zona che risultava positiva per Mertk ed ADAM17, è stata suddivisa in quintili numerandoli in ordine crescente con direzione dal LC verso il cappuccio fibroso. E' stata quindi determinata la densità in pixel (% densità di unità di grigio) delle suddette proteine.

Analisi di presenza di apoptosi

Nelle sezioni di campioni di placca carotidea è stata valutata la presenza di cellule apoptotiche tramite analisi di frammentazione del DNA utilizzando il kit ApopTag Peroxidase *In Situ* Oligo Ligation (ISOL, Chemicon International Inc., Temecula, California). In breve, tale tecnica si

basa sulla specificità dell'enzima T4 DNA ligasi che lega in modo covalente le estremità complementari di una coppia di molecole a doppia elica di DNA. La rilevazione è successivamente effettuata attraverso la coniugazione streptavidina-perossidasi e l'utilizzo del substrato Diaminobenzidina (DAB) visualizzabile in microscopia a campo luminoso. I nuclei contenenti i frammenti di DNA sono colorati di marrone e le cellule sono contrastate con methyl green. La positività cellulare è stata calcolata contando in 10 campi random ad ingrandimento 400X e il numero delle cellule positive è stato percentualmente espresso in almeno 1.000 cellule contate (28).

Estrazione RNA totale contenuto nelle placche e nelle cellule THP-1

I segmenti di placca sottoposti ad analisi biomolecolare sono stati immediatamente congelati in azoto liquido e conservati a -80 °C fino al momento dell'analisi.

Per l'estrazione dell'RNA i campioni sono stati omogenati tramite dismembratore meccanico con biglie di acciaio sottoposte a rapida agitazione, in soluzione monobasica contenente fenolo e guanidina tiocianato (buffer di lisi QIAzol) e poi è stato utilizzato l'RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania). In breve, dopo centrifugazione dell'omogenato e aggiunta di cloroformio si sono ottenute 3 fasi distinte; di queste la fase acquosa contenente l'RNA, è stata poi trasferita in colonne fornite dal kit. L'RNA trattenuto in colonna dopo alcuni lavaggi con etanolo e buffer RPE (Qiagen, Hilden, Germania), è stato eluito con acqua RNasi-free mediante centrifugazione per 1' a 14000 rpm.

Anche per l'estrazione dell'RNA dalle cellule THP-1 è stato utilizzato l'RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germania).

Una piccola aliquota dell'RNA totale ottenuto (1 µL) è stata sottoposta a controllo qualitativo e quantitativo tramite Agilent 2100 Bioanalyzer dotato di Chip RNA 6000 Nano (piattaforma microfluidica su chip miniaturizzato in vetro; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California,

USA). La valutazione qualitativa e quantitativa dei singoli campioni è stata determinata tramite software dedicato.

Real-Time PCR

Le sequenze di RNA sono state retrotrascritte tramite reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) con l'utilizzo di iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA). I livelli di espressione relativa dei geni di interesse (ADAM17, Caspasi3, BID, Bax, p53, TNFRSF-9, XIAP, Bcl2, Mertk, Axl, Tyro3, GAS6) sono stati effettuati in triplicato in 25 µL usando QuantiTect Primer Assay e QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen) con MyiQ Single-Color-Real Time PCR Detection System (Bio-rad, Hercules, California, USA). I cicli di amplificazione prevedevano 15 minuti a 95 °C, 40 cicli a 94 °C per 15 secondi e 55 °C per 30 secondi seguiti da 72 °C per 30 secondi, infine 55 °C per 20 secondi. Come normalizzatore è stato usato il primer QuantiTect Hs_ACTB (Qiagen, Hilden, Germania). I dati di espressione genica sono stati analizzati automaticamente da un software dedicato.

Preparazione del PE

I segmenti di placca provenienti da zone circostanti il LC sono stati pesati, congelati in azoto liquido, polverizzati utilizzando il dismembratore, estratti con 1,5 mL di acqua/metanolo (1:1 ogni 100 mg di tessuto) ed essiccati sotto azoto filtrato. Infine l'estratto è stato concentrato in 100 µL di acqua/metanolo (1:1 ogni 100 mg di tessuto). Un pool di PE proveniente da diverse placche è stato utilizzato come agonista negli esperimenti *in vitro*.

Colture cellulari

Per l'allestimento del modello *in vitro*, è stata utilizzata la linea immortalizzata macrophage-like THP-1, fatta crescere in terreno appropriato RPMI 1640, contenente 10% siero fetale di

vitello (FCS), 2 mM glutamina, 50 U/mL penicillina e 5 µg/mL streptomina a 37 °C in atmosfera umidificata con 5% CO₂. Prima degli esperimenti le cellule sono state poste in piastre da 24 pozzetti con RPMI senza FCS per 2 h, successivamente in RPMI con 1% FCS.

Trasfezione e silenziamento

I due silenziatori validati (siRNA) per il gene ADAM17 validate (SI02664501 e SI02664508) e il controllo negativo fluorescein-labelled non-silencing siRNA (AllStars Negative Control 1027282) sono stati forniti dalla ditta Qiagen (Hilden, Germania).

La trasfezione è stata effettuata in piastre da 24 pozzetti usando HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen, Hilden, Germania) seguendo il protocollo indicato.

Brevemente, il giorno antecedente la trasfezione le cellule sono poste in piastre multipozzetto (ad una densità pari a 2×10^4 cellule per pozzetto) in terreno RPMI privo di FCS per 2 h, e successivamente in RPMI addizionato con 1% FCS. Il giorno della trasfezione, 375 ng di siRNA sono stati diluiti in 100 µL di RPMI con l'aggiunta di 6 µL di HiPerfect Transfection Reagent, per la formazione del complesso di trasfezione. A ciascun pozzetto sono stati poi aggiunti il complesso per 6 h, e successivamente 400 µL di RPMI per il tempo ottimale di incubazione (48 h) determinato dopo esperimenti di time-course.

Citofluorimetria

Per l'analisi citofluorimetrica sono state poste in piastre da 6 pozzetti circa 2×10^6 cellule in RPMI per 2 h e poi incubate con 40 µL di PE per ogni mL di medium con 1% FCS per 4 e 24 h. Le cellule sono state staccate e incubate per 1 h a temperatura ambiente in 40 µL di PBS/BSA 0,5% contenente 1 µL dei seguenti anticorpi: MERTK (Y323, 1:400, ab52968, Abcam Ltd, Cambridge, Gran Bretagna), ADAM17 Ectodomain (500 ng/106 cells, MAB9301, R&D Systems Inc, Minneapolis, MN). Dopo lavaggio, le cellule sono state incubate per 30 minuti con anticorpo secondario rispettivamente anti-rabbit (per MERTK) e anti-mouse (per ADAM17)

marcati con fluoresceina isotiocianato (FITC). I campioni sono stati analizzati in citofluorimetria usando FACSCalibur e il software dedicato FlowJo analysis (BD Biosciences, New Jersey, USA).

Western Blotting

L'estratto cellulare totale da cellule e tessuti è stato ottenuto mediante l'utilizzo del Nuclear Extract Kit (Active Motif, Belgio). Dopo la quantificazione le proteine sono state separate mediante elettroforesi in gel di poliacrilamide e quindi trasferite su membrana di nitrocellulosa. La membrana è stata sottoposta a blocking con 5% Non Fat Dry Milk in soluzione TBS-0,05%Tween20 e poi incubata a 4 °C over night con i seguenti anticorpi primari: ADAM17 (1:300, ab57484, Abcam Ltd, Cambridge, Gran Bretagna), Mer (0,5 µg/ml, MAB8911, R&D Systems Inc, Minneapolis, MN), p53 (pAb 240, 1:1000, ab26, Abcam Ltd, Cambridge, Gran Bretagna), Caspasi3 (1:500, AAS-103, Assay Designs Inc, Ann Arbor, MI), Bax (1:1000, AAS-040, Assay Designs Inc, Ann Arbor, MI), Axl C-terminal (1:400, ab72069, Abcam Ltd, Cambridge, Gran Bretagna), Tyro3 (1µg/ml, ab79778, Abcam Ltd, Cambridge, Gran Bretagna), GAS6 (0,2 µg/ml, AF885, R&D Systems Inc, Minneapolis, MN), TNFRSF-9 (CD137, BBK-2, 1:2000, ab3169, Abcam Ltd, Cambridge, Gran Bretagna), XIAP (2 µg/ml, ab21278, Abcam Ltd, Cambridge, Gran Bretagna), Bcl2 (1:2000, AAS-070, Assay Designs Inc, Ann Arbor, MI) e beta-actina (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA). Le proteine sono state rivelate con i corrispettivi anticorpi secondari coniugati a perossidasi in chemiluminescenza. La densità delle bande è stata quantificata con Versadoc Imaging (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

Altre analisi

Apoptosi precoce e vitalità cellulare sono state determinate usando rispettivamente l'AnnexinV-FITC Kit (Bender MedSystem GmbH, Vienna, Austria) e la 7-amino-actinomycin D (7-AAD) (BD Biosciences, New Jersey, USA), in citofluorimetria.

La concentrazione della proteina umana GAS6 è stata determinata usando il kit DuoSet ELISA Development System fornito dalla ditta R&D System Europe Inc (Minneapolis, MN).

Le proteine totali sono state determinate usando il BCA protein assay (Pierce, Rockford, USA).

Analisi statistica

Tutti i dati sono espressi come media \pm deviazione standard (SD). Le differenze significative tra i gruppi sono state determinate usando il test t di Student per dati non appaiati. E' stata considerata statisticamente significativa una probabilità pari a $p < 0.05$. L'analisi statistica è stata effettuata tramite StatView per Windows (SAS Publishing).

RISULTATI

Localizzazione delle cellule apoptotiche nelle placche carotidee umane

La maggior parte delle cellule apoptotiche nelle placche carotidee umane (valutate con ApopTag Peroxidase *In Situ* Oligo Ligation) sono localizzate nelle aree ricche in macrofagi al bordo più esterno del LC e del cappuccio fibroso, come evidenziato in Figura 3.

La positività delle cellule è significativamente più elevata nelle aree circostanti il LC rispetto alle aree P delle placche carotidee ($11.8 \pm 1.5\%$ versus $2.9 \pm 0.9\% \times 1000$ cellule, $p < 0.01$).

Espressione (mRNA e proteina) dei fattori correlati all'apoptosi, recettori TAM, GAS6 e ADAM17 nelle placche carotidee umane

Le Figure 4 e 5 evidenziano l'espressione (mRNA e proteina) dei recettori TAM (Merk, Axl e Tyro3), di GAS6 e ADAM17 (Figura 4 A e B) e di Caspasi3, Bax, BID, p53, TNFRSF-9, XIAP e Bcl2 (Figura 5 A e B) nelle placche carotidee umane. Tra i recettori TAM, solo Merk è risultato significativamente più alto nel LC rispetto a P ($p < 0.01$). Anche l'espressione di ADAM17, ma non di GAS6, è significativamente più elevata nel LC rispetto a P ($p < 0.01$). Tra i geni correlati all'apoptosi Caspasi3, Bax, p53, TNFRSF-9 sono significativamente più espressi nel LC rispetto a P (p da < 0.03 a < 0.005).

Localizzazione immunoistochimica delle proteine ADAM17 e Mertk

La Figura 6 (A e B) mostra l'andamento della positività immunoistochimica per ADAM17 e Mertk in alcune aree localizzate circostanti il LC. Ambedue le proteine ADAM17 e Mertk sono co-localizzate nelle aree con positività CD68 per i macrofagi (Figura 7 A-E).

Allo scopo di ottenere anche una precisa valutazione quantitativa, le aree positive per ADAM17 e Mertk sono state suddivise in quintili a partire dalla porzione più interna verso l'esterno (1° quintile al bordo più esterno del LC) (Figure 8 A e B e 9 A e B). Come quantificato in Figura 10, il segnale di ADAM17 e Mertk ha mostrato un trend opposto, essendo il segnale ADAM17 del 92% più basso nel 5° quintile rispetto al 1° ed il Mertk

dell'86% più basso nel 1° quintile rispetto al 5° ($p < 0.01$).

Effetto del PE sull'espressione (mRNA e proteine) dei fattori correlati all'apoptosi, dei recettori TAM, GAS6 e ADAM17 nelle cellule THP-1

L'incubazione delle cellule THP-1 con PE per 24 h ha aumentato significativamente l'espressione sia dell'mRNA sia delle proteine dei recettori TAM (Mertk e Axl) e di GAS6 ($p < 0.01$) e della metalloproteinasi ADAM17 ($p < 0.01$), (Figura 11 A e B). Inoltre, il PE ha indotto un aumento significativo dell'espressione dei geni correlati all'apoptosi Caspasi3, Bax, p53, TNFRSF-9, BID e XIAP ma non di Bcl2, (p da < 0.01 a < 0.005) (Figura 12 A e B).

Effetto tempo-dipendente del PE sul dominio extracellulare di Mertk e su ADAM17 nelle cellule THP-1

Poiché dopo 24 h di incubazione con PE in cellule THP-1 l'espressione proteica (in citofluorimetria) di ADAM17 continuava ad aumentare ($p < 0.01$), mentre il dominio extracellulare di Mertk era significativamente ridotto ($p < 0.01$) (Figura 13), è stato eseguito un esperimento di time-course dell'espressione proteica di ADAM17 e di Mertk. I nostri risultati evidenziano come l'incubazione delle cellule THP1 con PE per 4 h abbia determinato un aumento significativo di entrambi Mertk e ADAM17 ($p < 0.01$), (Figura 13). Il silenziamento tramite siRNA del gene per ADAM17 ha attenuato la riduzione del dominio extracellulare di Mertk nelle cellule THP-1 stimulate con PE a 24 h ($p < 0.01$), come evidenziato sia in citofluorimetria (Figura 14) che con Western Blotting (Figura 15).

E' interessante sottolineare che la riduzione del dominio extracellulare di Mertk è associata all'aumento di sMer nel medium di coltura ($p < 0.01$), come mostrato nella Figura 15. Il silenziamento con siRNA del gene ADAM17 riduce l'incremento di sMer nel medium ($p < 0.01$), dimostrando che la metalloproteinasi è responsabile del clivaggio del dominio extracellulare del recettore Mertk. Poiché nelle condizioni sperimentali sopradescritte non sono stati

osservati cambiamenti per quanto riguarda la vitalità cellulare e l'apoptosi precoce rispetto alle cellule non trattate (non stimolate con PE), (dati non mostrati), possiamo escludere che la riduzione dell'espressione proteica di Mertk possa essere dovuta ad un effetto citotossico del PE.

sMer modula la concentrazione di GAS6 nel medium delle cellule THP-1 stimolate con PE

Poiché la molecola ponte GAS6 viene secreta dalle cellule, tramite esperimenti di time-course abbiamo evidenziato come la concentrazione di GAS6 (ELISA) nel supernatante delle cellule sia aumentata in modo significativo dopo 4 h di incubazione con PE ($p < 0.01$), mentre si riduca considerevolmente dopo 24 h ($p < 0.01$), fino a raggiungere anche valori inferiori delle cellule non trattate (Figura 16 A).

Il silenziamento di ADAM17 previene la riduzione di GAS6 nel supernatante dopo stimolazione delle THP-1 con PE per 24 h (Figura 16 A), suggerendo che tale riduzione sia principalmente correlata con la formazione di sMer. A conferma di questa ipotesi l'aggiunta della proteina ricombinante sMer Fc Chimera alle concentrazioni di 10, 20 e 30 nmol/L ha indotto una significativa ($p < 0.01$) riduzione dose-dipendente dei valori di GAS6, come evidenziato in Figura 16 B.

TABELLE E FIGURE

Tabella 1. Caratteristiche istologiche ed immunoistochimica per i macrofagi di 17 placche carotidee.

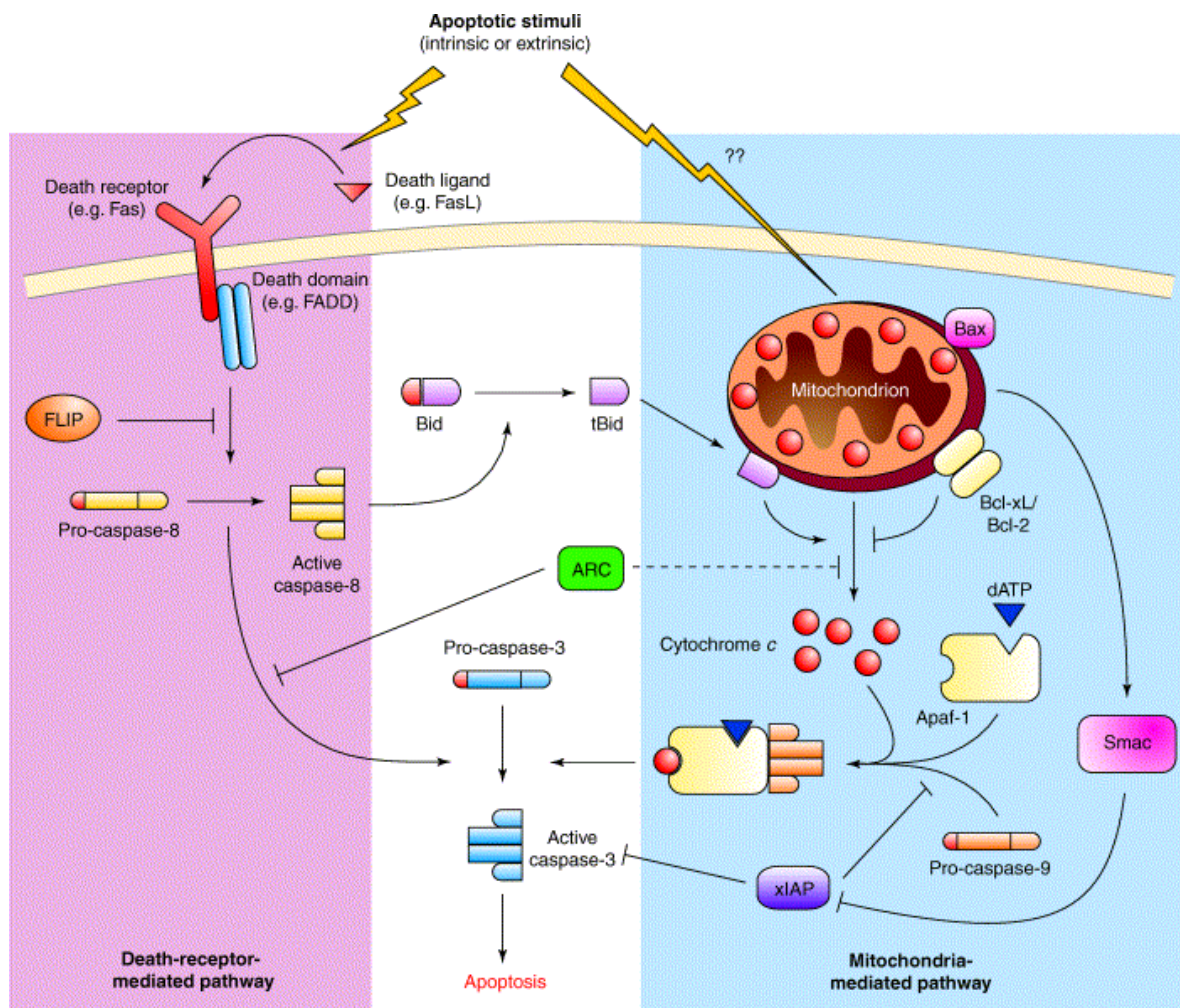
CASO	CD68	PRESENZA DI CALCIFICAZIONI	SPESSORE DEL CAPPUCCIO FIBROSO (μm)	FISSURAZIONE DEL CAPPUCCIO FIBROSO	DIMENSIONI DEL CORE LIPIDICO (μm)
1	+++	-	160	+	620
2	++	+	20	+	230
3	++	+	110	+	340
4	+++	++	100	-	920
5	++	++	160	-	870
6	+++	-	130	-	920
7	+++	-	30	-	780
8	+++	-	30	+	420
9	+++	+	60	-	380
10	+++	+	60	+	440
11	+++	-	110	-	1200
12	+	-	70	-	140
13	++	++	50	+	220
14	++	+	150	-	870
15	++	-	95	-	700
16	+++	+	110	-	620
17	+++	-	40	+	680

Legenda: - = nessuno

+ = alcuni

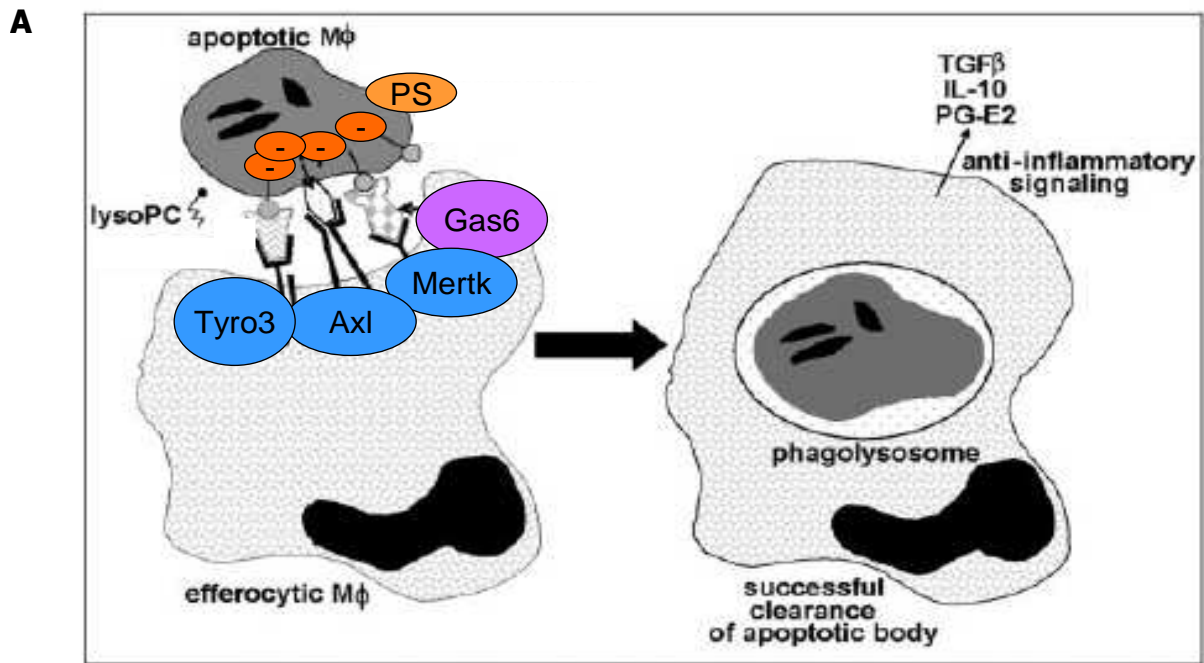
++= abbondanti

+++ = molto abbondanti

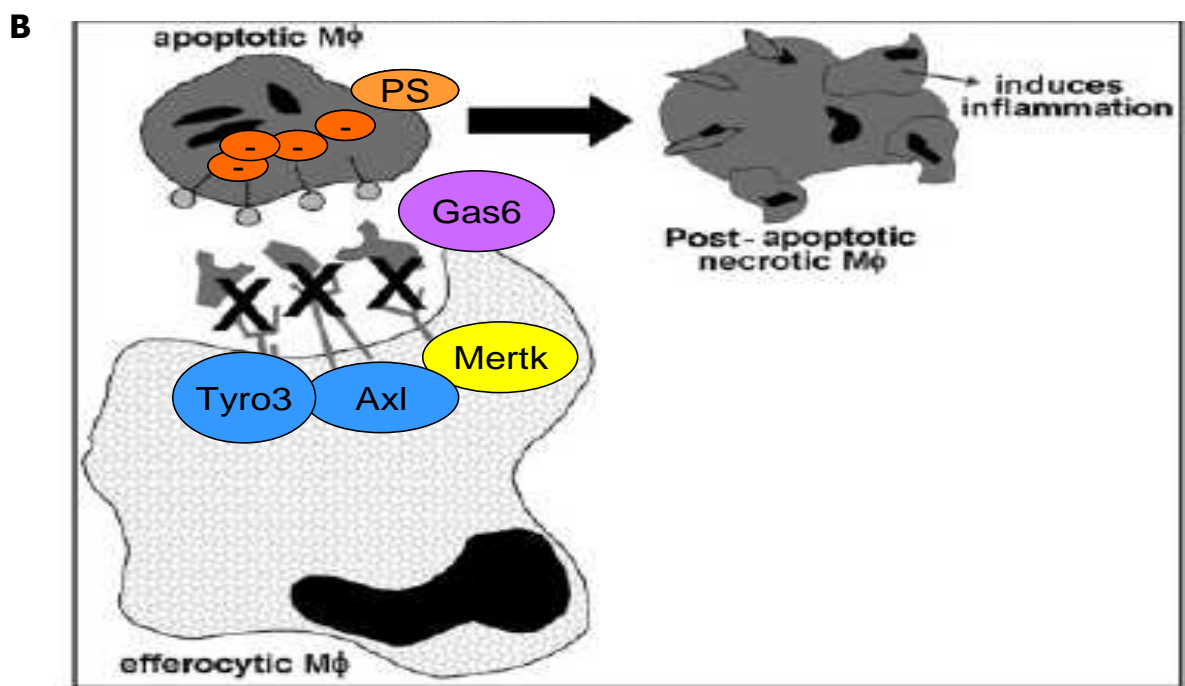


TRENDS in Molecular Medicine

Figura 1. Rappresentazione schematica delle principali vie di segnale dell'apoptosi. L'apoptosi indotta in risposta a diversi stimoli è mediata da due differenti vie di segnale, la via estrinseca o recettoriale e la via intrinseca o mitocondriale; entrambe confluiscono nell'attivazione della cascata delle caspasi e alla morte cellulare.



Thorp E., JLB 2009



Thorp E., JLB 2009

Figura 2. Efferocitosi di macrofagi apoptotici

Legenda: (A) Efferocitosi efficiente dei corpi apoptotici

(B) Efferocitosi difettiva per disfunzione recettoriale

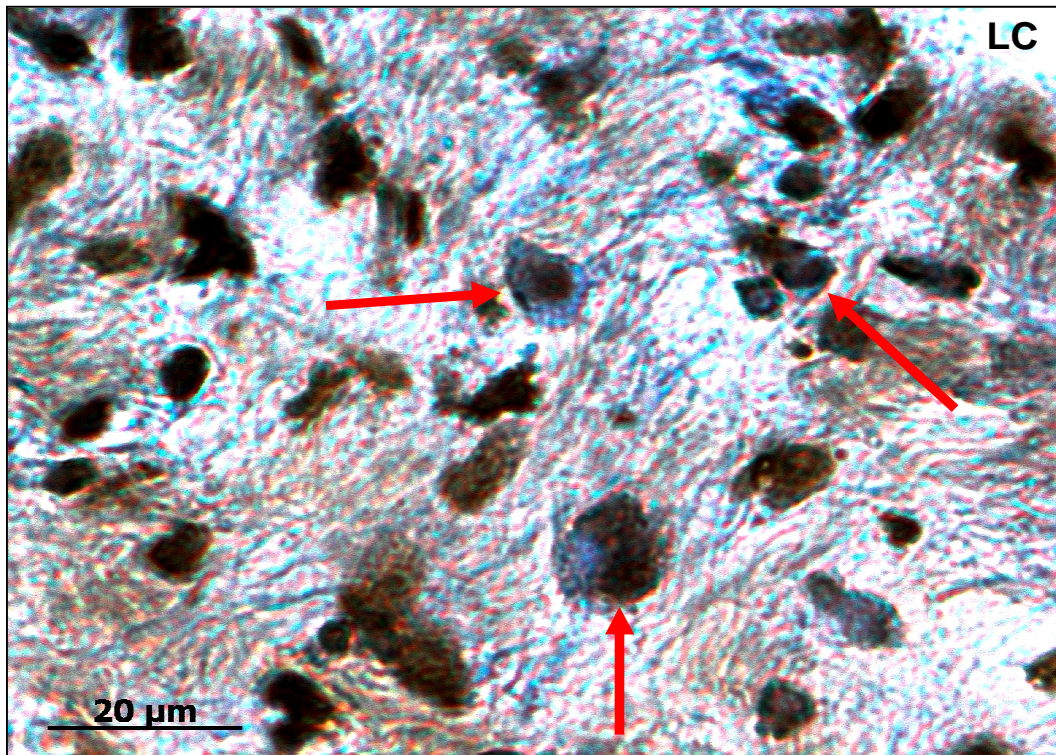


Figura 3. Esempio di cellule apoptotiche presenti nell'area ricca di macrofagi adiacente il core lipidico (LC) di placche carotidee umane.

Legenda: le frecce indicano i nuclei contenenti il DNA frammentato (colorato di marrone) e le cellule apoptotiche sono contrastate con methyl green.

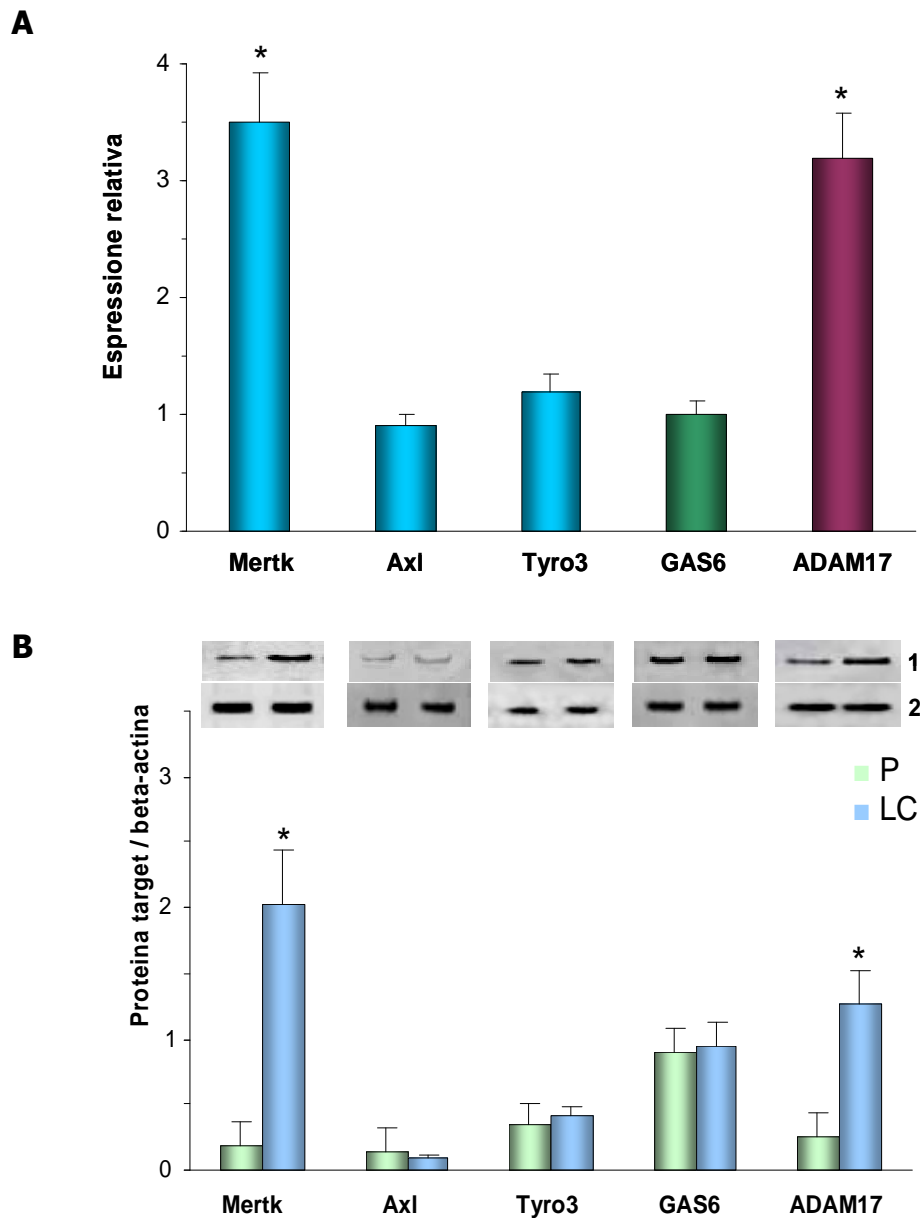


Figura 4. Espressione genica (mRNA) e proteica dei recettori TAM (Mertk, Axl e Tyro3), di GAS6 e ADAM17 nell'area adiacente il core lipidico (LC) e nella periferia (P).

Legenda: (A) l'mRNA è stato analizzato tramite Real-Time PCR e i livelli di espressione di ciascun gene sono stati normalizzati rispetto alla beta-actina. I dati sono espressi come espressione relativa, ossia rapporto tra i geni normalizzati di LC e quelli normalizzati della zona P;

(B) analisi di Western Blotting per le proteine indicate e la media è ottenuta tramite analisi densitometrica di tutti i campioni provenienti da LC e da P. I dati sono espressi come rapporto densitometrico della proteina target rispetto al controllo (beta-actina) in unità arbitrarie.

1. proteina target, 2. beta-actina.

* $p < 0.01$ di LC versus P.

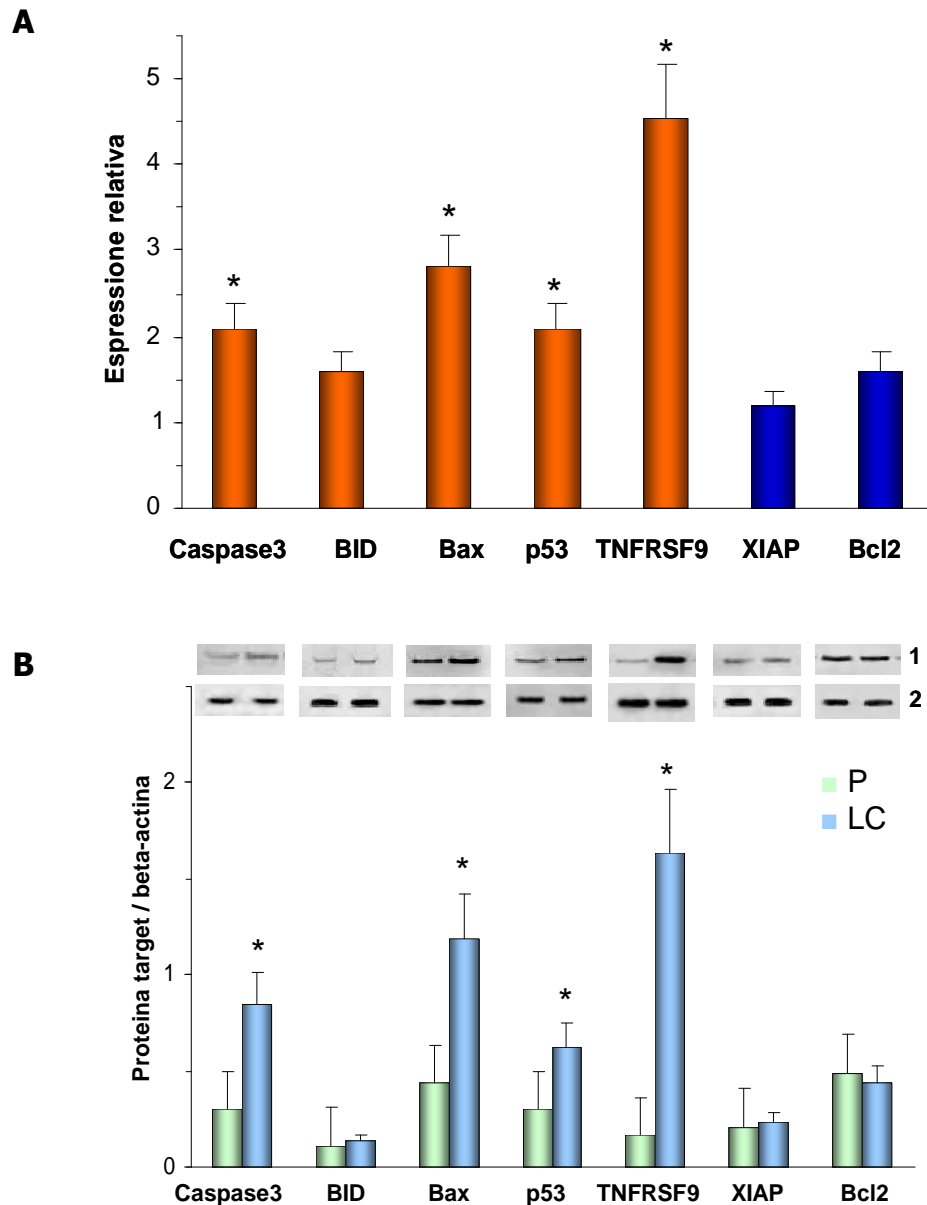


Figura 5. Espressione genica (mRNA) e proteica dei fattori proapoptotici Caspasi3, Bax, BID, p53, TNFRSF-9 e antiapoptotici XIAP e Bcl2 nell'area attorno al core lipidico (LC) e nella periferia (P).

Legenda: (A) l'mRNA è stato analizzato tramite Real-Time PCR. I livelli di espressione di ciascun gene sono stati normalizzati rispetto alla beta-actina e i dati sono espressi come espressione relativa, ossia rapporto tra i geni normalizzati di LC e quelli normalizzati della zona P;

(B) analisi di Western Blotting per le proteine indicate. La media è ottenuta tramite analisi densitometrica di tutti i campioni provenienti da LC e da P. I dati sono espressi come rapporto densitometrico della proteina target rispetto al controllo (beta-actina) in unità arbitrarie.

1. proteina target, 2. beta-actina.

* p da <0.03 a 0.005 di LC versus P.

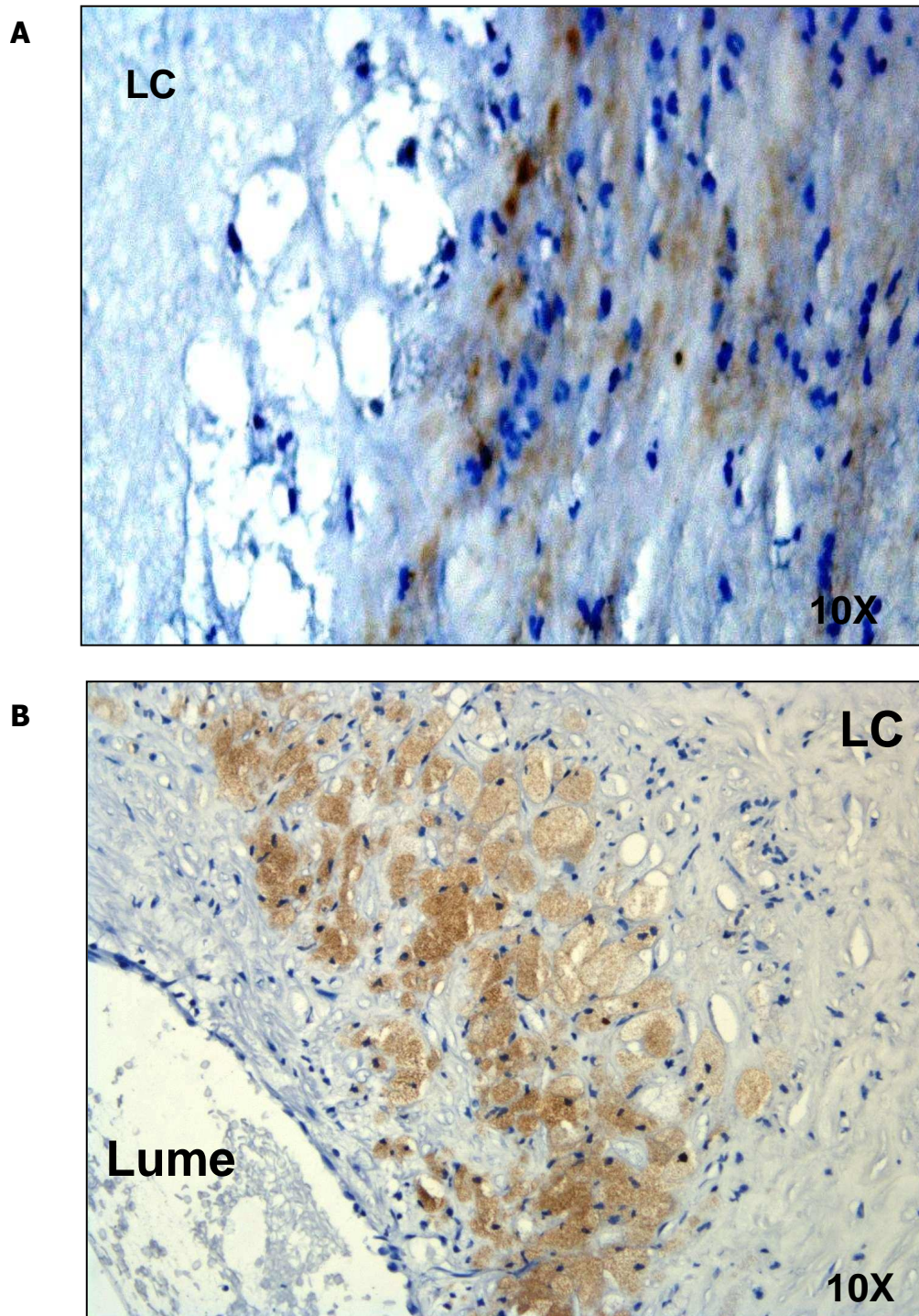


Figura 6. Esempio di immunohistochimica di ADAM17 (A) e Mertk (B) nell'area vicino al core lipidico (LC) delle placche aterosclerotiche ad ingrandimento 10X.

Legenda: La positività delle proteine è indicata con il colore marrone e i campioni sono stati contrastati con ematossilina.

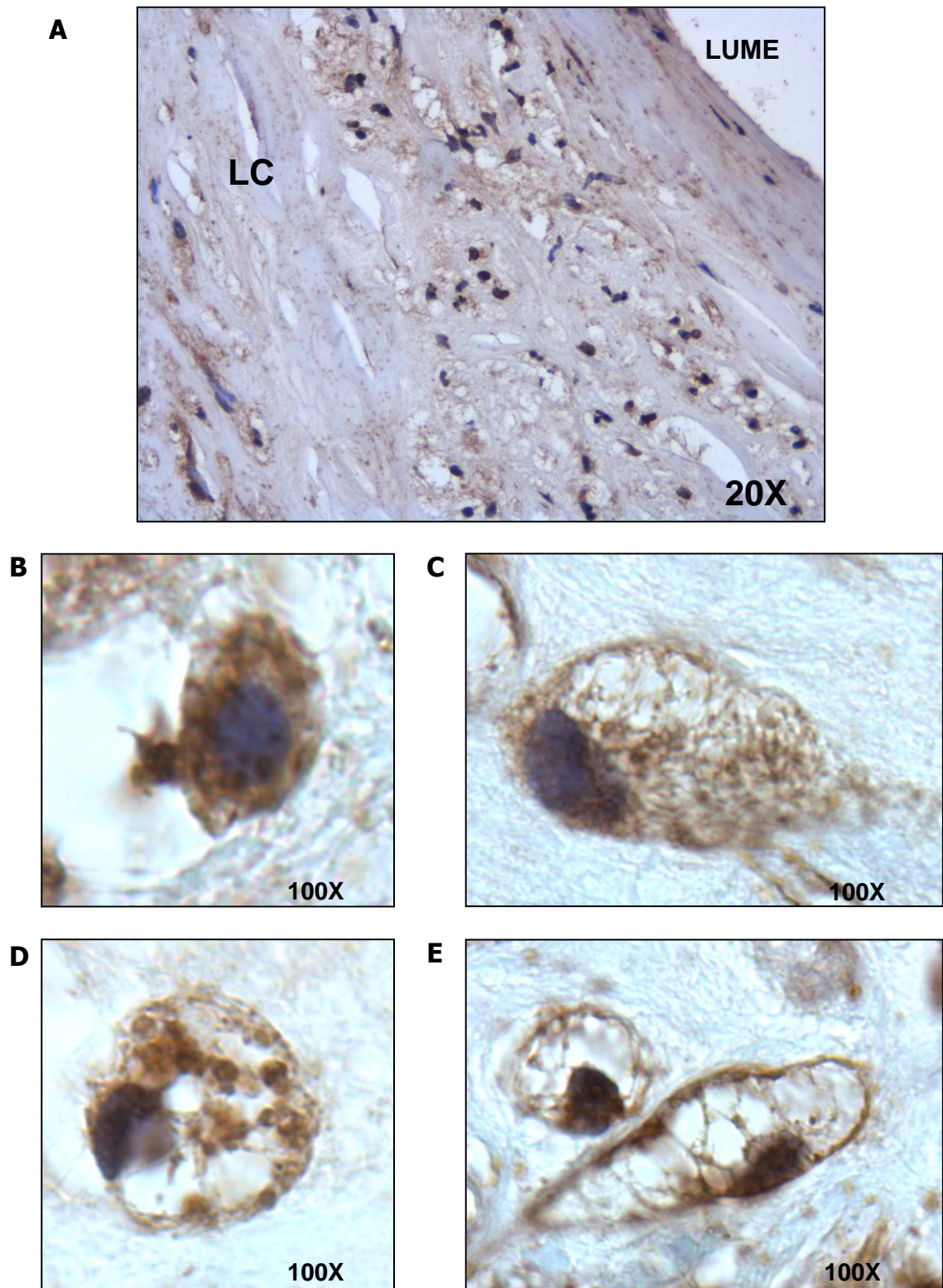


Figura 7. Esempio di immunohistochimica di CD68 nell'area circostante il core lipidico (LC) nelle placche aterosclerotiche.

Legenda: (A) area di ricca di macrofagi (20X); (B) monocita (100X), (C), macrofago che si sta trasformando in foam cell (100X), (D) monocita foam cell (100X), (E) 2 foam cells (100X). La positività è indicata con il colore marrone e tutti i campioni sono stati contrastati con ematossilina.

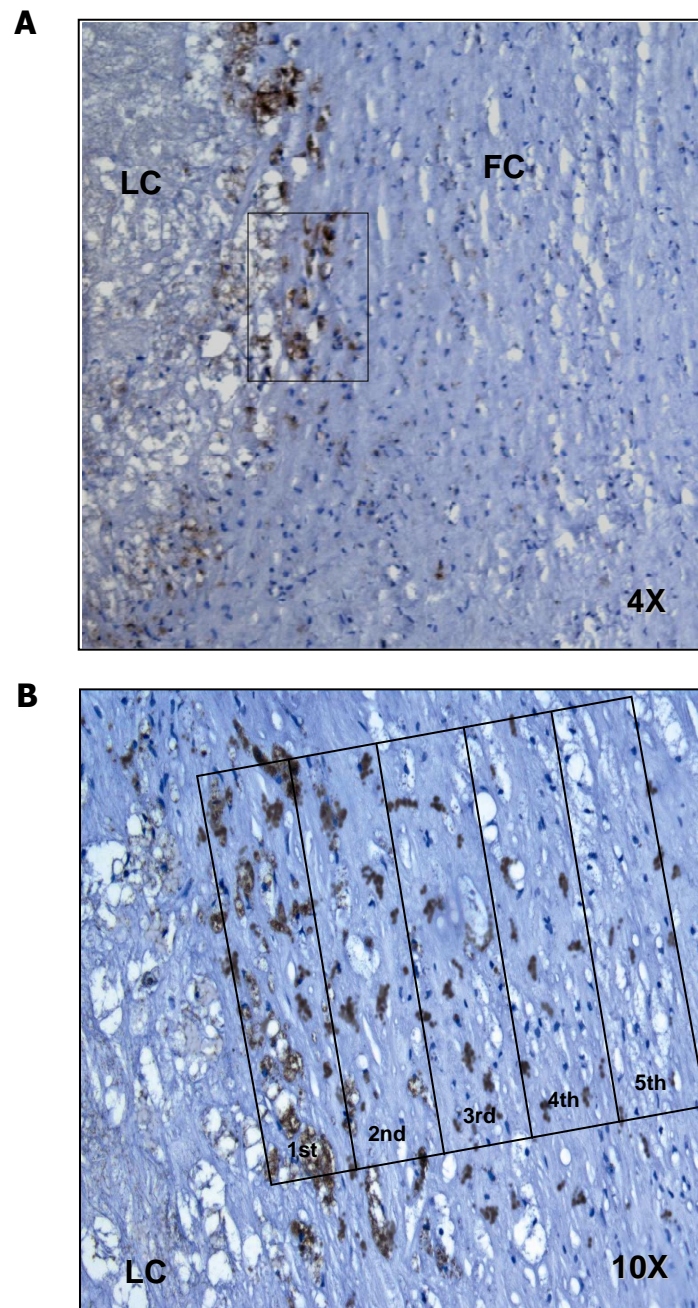


Figura 8. Rappresentazione della suddivisione in quintili dell'area positiva per ADAM17 in immunistochemica nell'area circostante il core lipidico (LC).

Legenda: (A) ingrandimento 4X;

(B) ingrandimento 10X dell'area indicata dal riquadro e suddivisa in quintili (il primo quintile vicino al lato esterno del LC). FC = cappuccio fibroso.

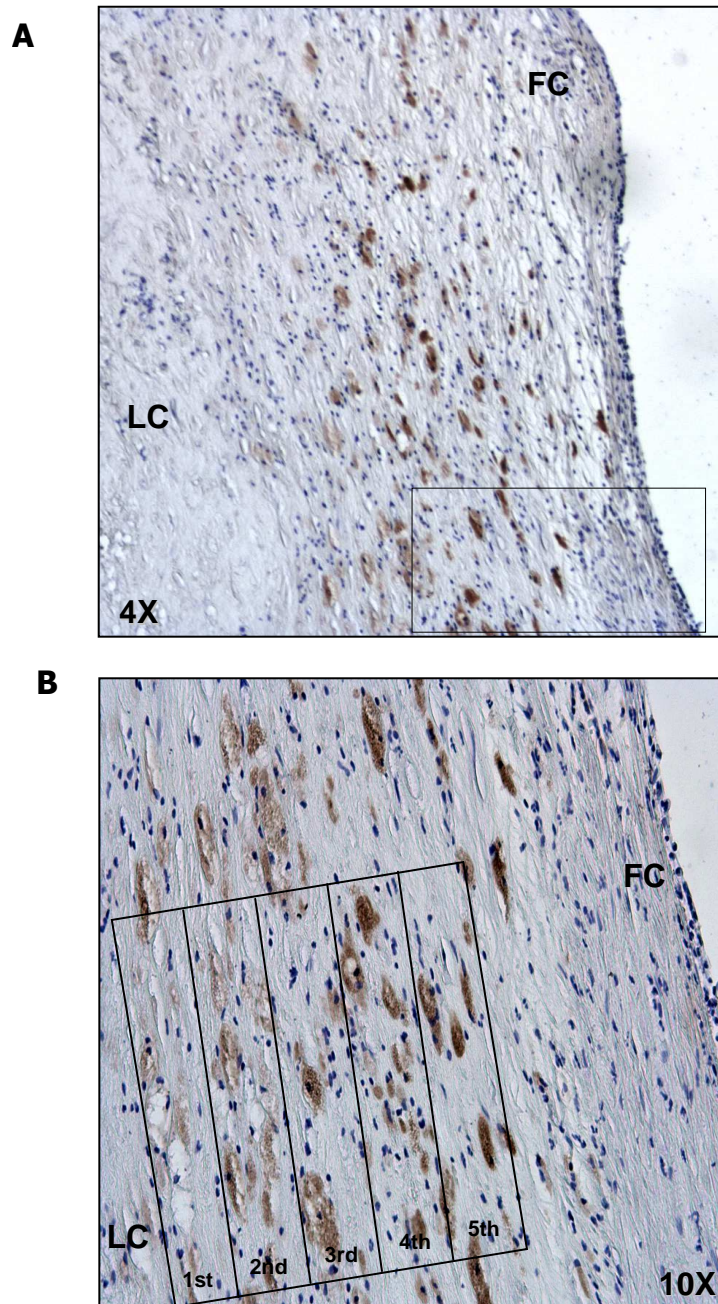


Figura 9. Rappresentazione della suddivisione in quintili dell'area positiva per Mertk in immunistochemica nell'area circostante il core lipidico (LC).

Legenda: (A) ingrandimento 4X;

(B) ingrandimento 10X dell' area indicata dal riquadro e suddivisa in quintili (il primo quintile vicino al lato esterno del LC). FC = cappuccio fibroso.

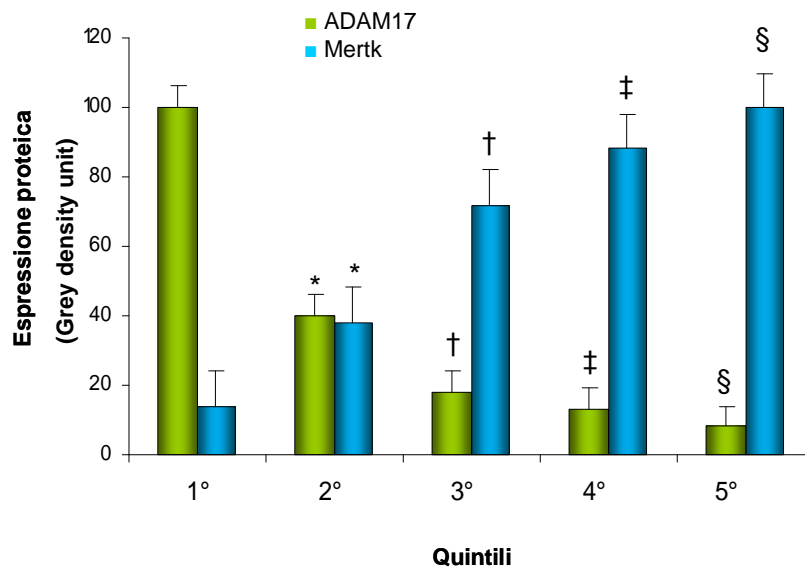


Figura 10. Quantificazione delle proteine ADAM17 e Mertk mediante quintili.

Legenda: nelle aree positive è stata determinata la densità in pixel (% densità di unità di grigio).

* $p < 0.01$ versus 1° quintile; †, ‡, § $p < 0.01$ versus 2°, 3° e 4° quintile.

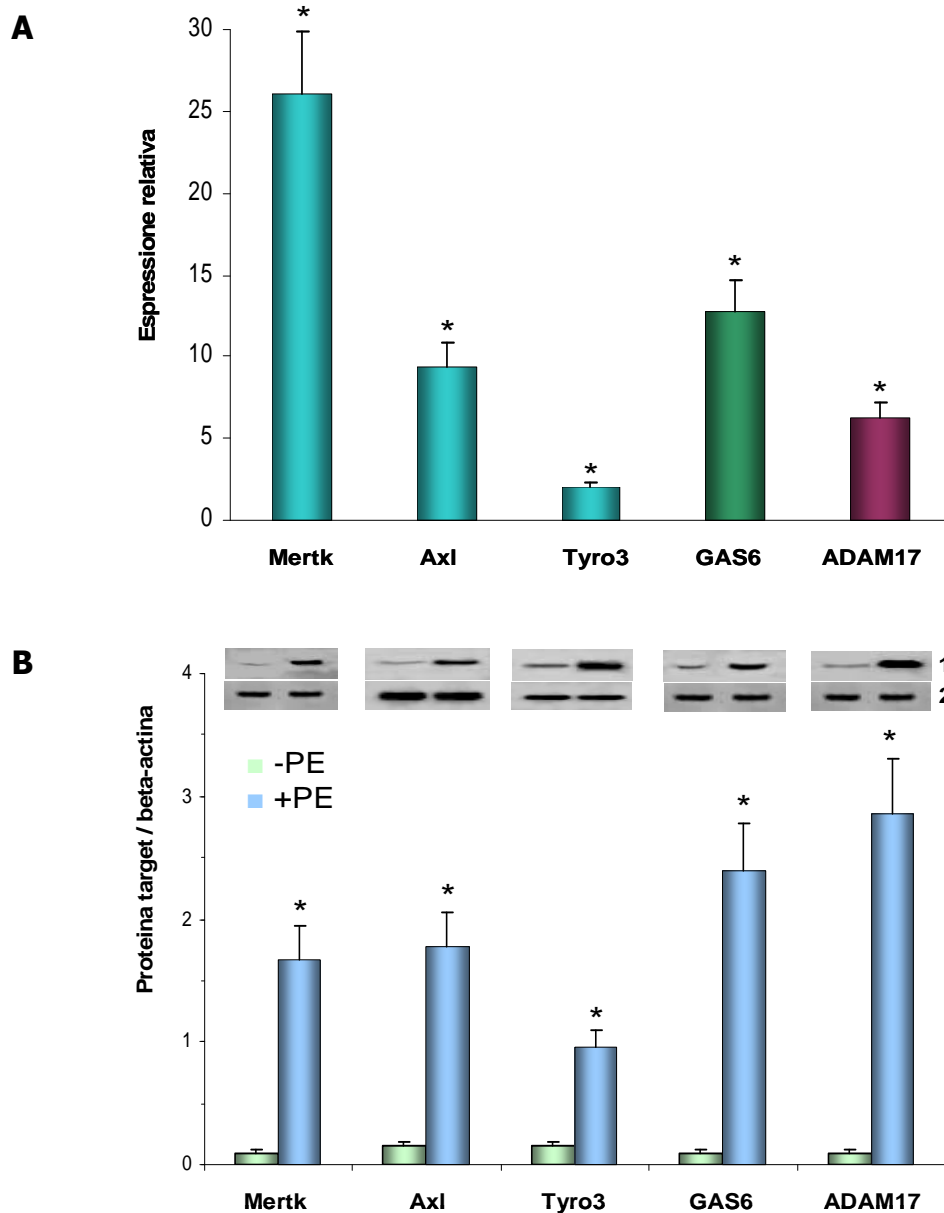


Figura 11. Espressione genica (mRNA) e proteica dei recettori TAM (Mertk, Axl e Tyro3), di GAS6 e ADAM17 in cellule THP-1 stimulate con estratto di placche (PE).

Legenda: (A) l'mRNA è stato analizzato tramite Real-Time PCR e i livelli di espressione di ciascun gene sono stati normalizzati rispetto alla beta-actina. I dati sono espressi come espressione relativa, ossia rapporto tra i geni normalizzati delle cellule stimulate (+PE) e di quelle non stimulate (-PE);

(B) analisi di Western Blotting per le proteine indicate e la media è ottenuta tramite analisi densitometrica di tutti i campioni provenienti da cellule stimulate (+PE) e non stimulate (-PE). I dati sono espressi come rapporto densitometrico della proteina target rispetto al controllo (beta-actina) in unità arbitrarie. 1. proteina target, 2. beta-actina.

* $p < 0.01$ versus cellule non stimulate (-PE).

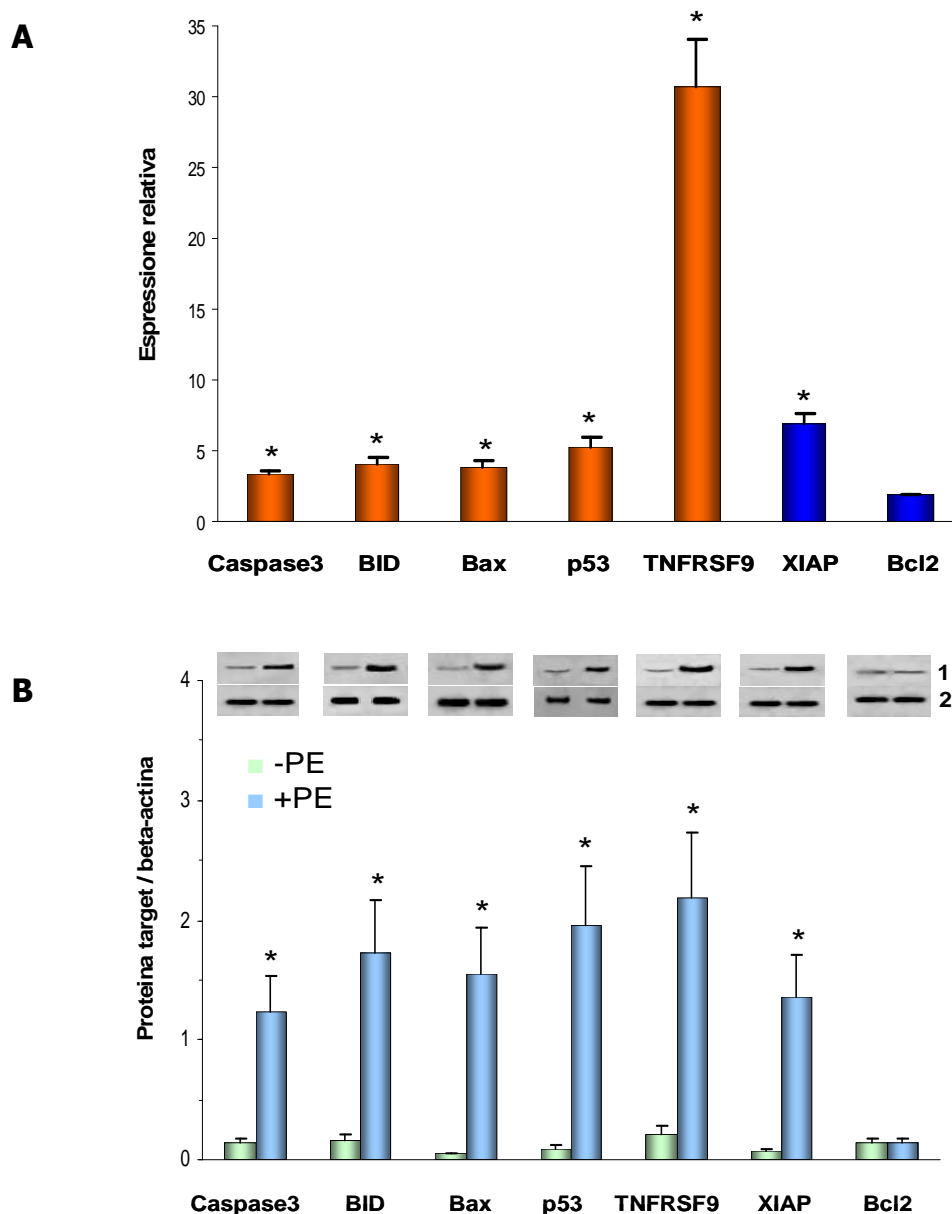


Figura 12. Espressione genica (mRNA) e proteica dei fattori proapoptotici Caspasi3, Bax, BID, p53, TNFRSF-9 e antiapoptotici XIAP e Bcl2 in cellule THP-1 stimulate con estratto di placche (PE).

Legenda: (A) l'mRNA è stato analizzato tramite Real-Time PCR e i livelli di espressione di ciascun gene sono stati normalizzati rispetto alla beta-actina. I dati sono espressi come espressione relativa, ossia rapporto tra i geni normalizzati delle cellule stimulate (+PE) e di quelle non stimulate (-PE);

(B) analisi di Western Blotting per le proteine indicate e la media è ottenuta tramite analisi densitometrica di tutti i campioni provenienti da cellule stimulate (+PE) e non stimulate (-PE). I dati di sono espressi come rapporto densitometrico della proteina target rispetto al controllo (beta-actina) in unità arbitrarie. 1. proteina target, 2. beta-actina.

* p da <0.01 a <0.005 versus cellule non stimulate (-PE).

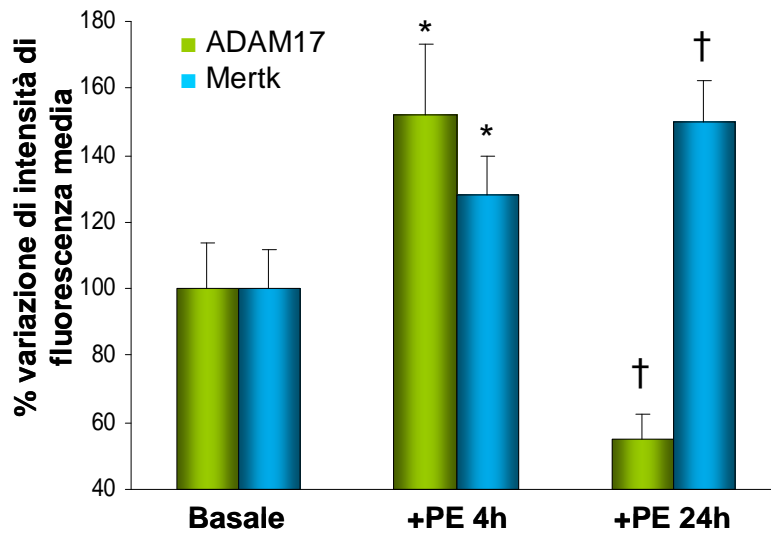
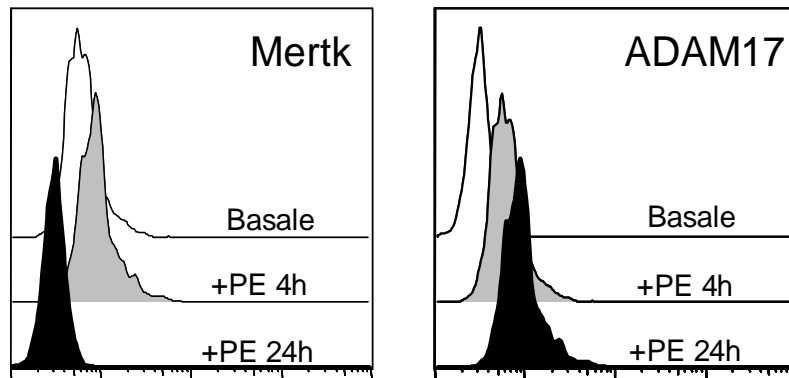


Figura 13. Time-course dell'espressione delle proteine Mertk e ADAM17.

Legenda: le cellule THP-1 sono state stimulate con estratto di placche (PE) per 4 h e 24 h.

I dati citofluorimetrici sono espressi come % di variazione dell'intensità di fluorescenza media delle cellule stimulate (+PE) rispetto alle non stimulate (basale).

* $p < 0.01$ versus basale; † $p < 0.01$ versus THP-1 stimulate con PE 4 h.

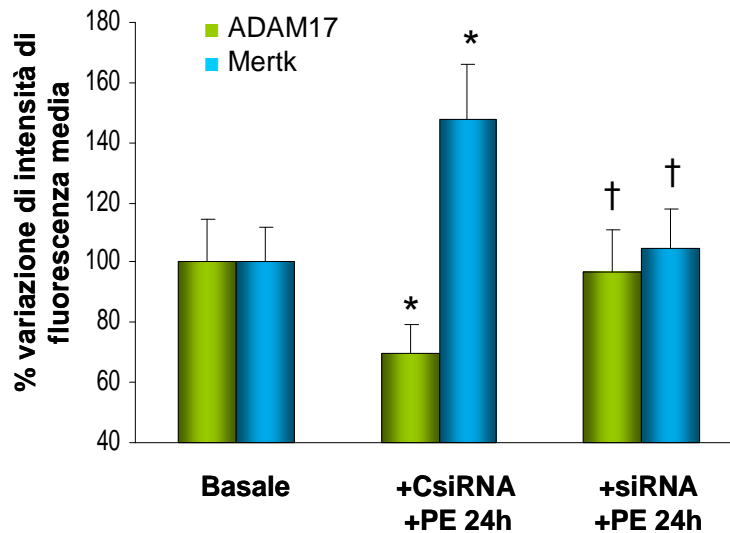
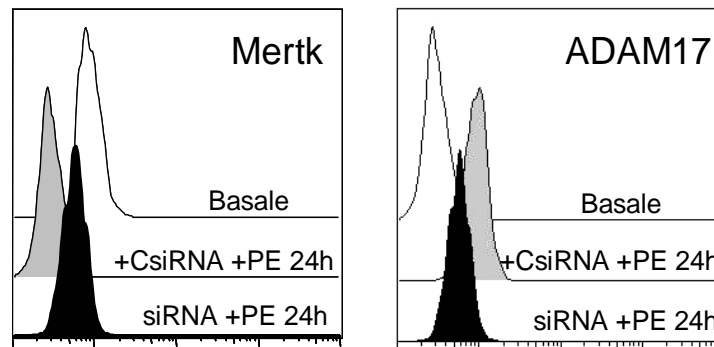


Figura 14. Analisi in citofluorimetria delle proteine Mertk e ADAM17.

Legenda: le cellule THP-1 sono state silenziate per ADAM17 e stimulate con estratto di placche (PE) per 24 h.

I dati citofluorimetrici sono espressi come % di variazione dell'intensità di fluorescenza media delle cellule stimulate (+PE) rispetto alle non stimulate (basale).

CsiRNA= controllo negativo di silenziamento.

* $p < 0.01$ versus basale; † $p < 0.01$ versus cellule stimulate, non silenziate (+CsiRNA +PE 24 h).

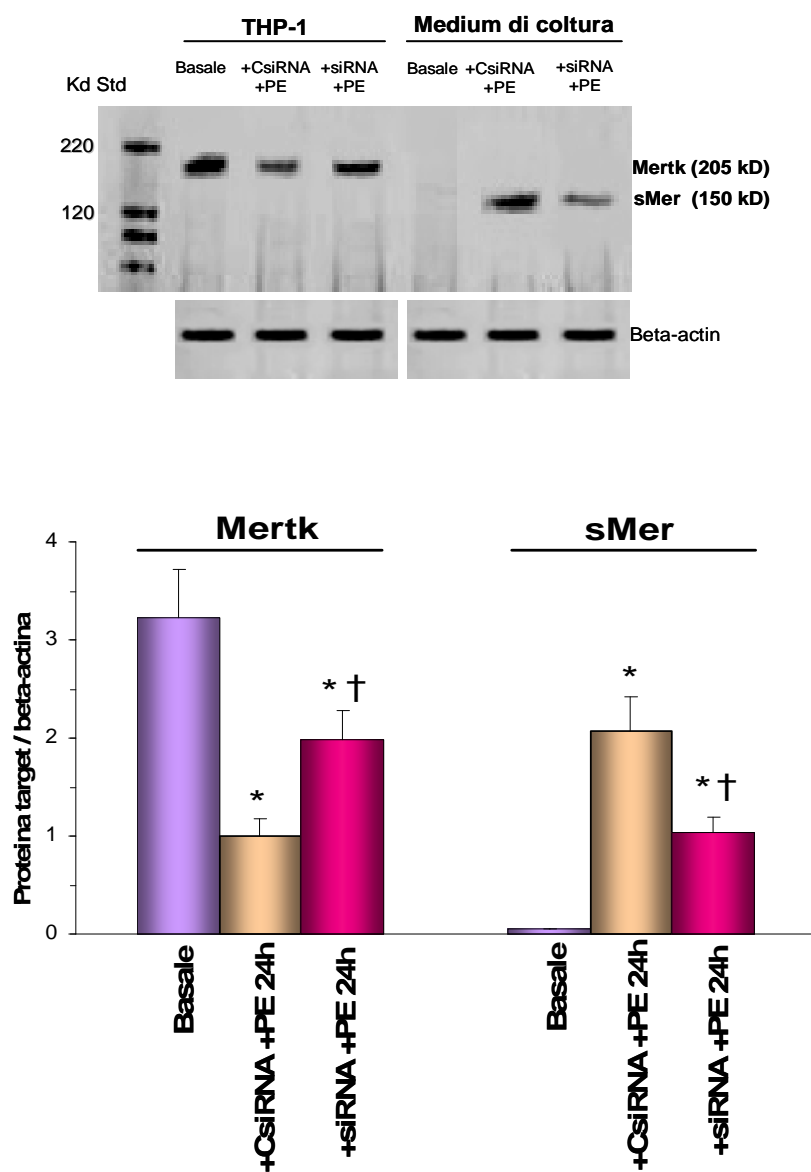


Figura 15. Western blotting di Mertk (205 kD) in cellule THP-1 e sMer (150 kD) nel medium di coltura.

Legenda: le cellule THP-1 sono state silenziate e stimolate con PE per 24 h. I dati sono espressi come rapporto densitometrico della proteina target rispetto al controllo (beta-actina) in unità arbitrarie.

CsiRNA= controllo negativo di silenziamento

* $p < 0.01$ versus basale (cellule non stimolate); † $p < 0.01$ versus cellule stimolate, non silenziate (+CsiRNA +PE 24 h).

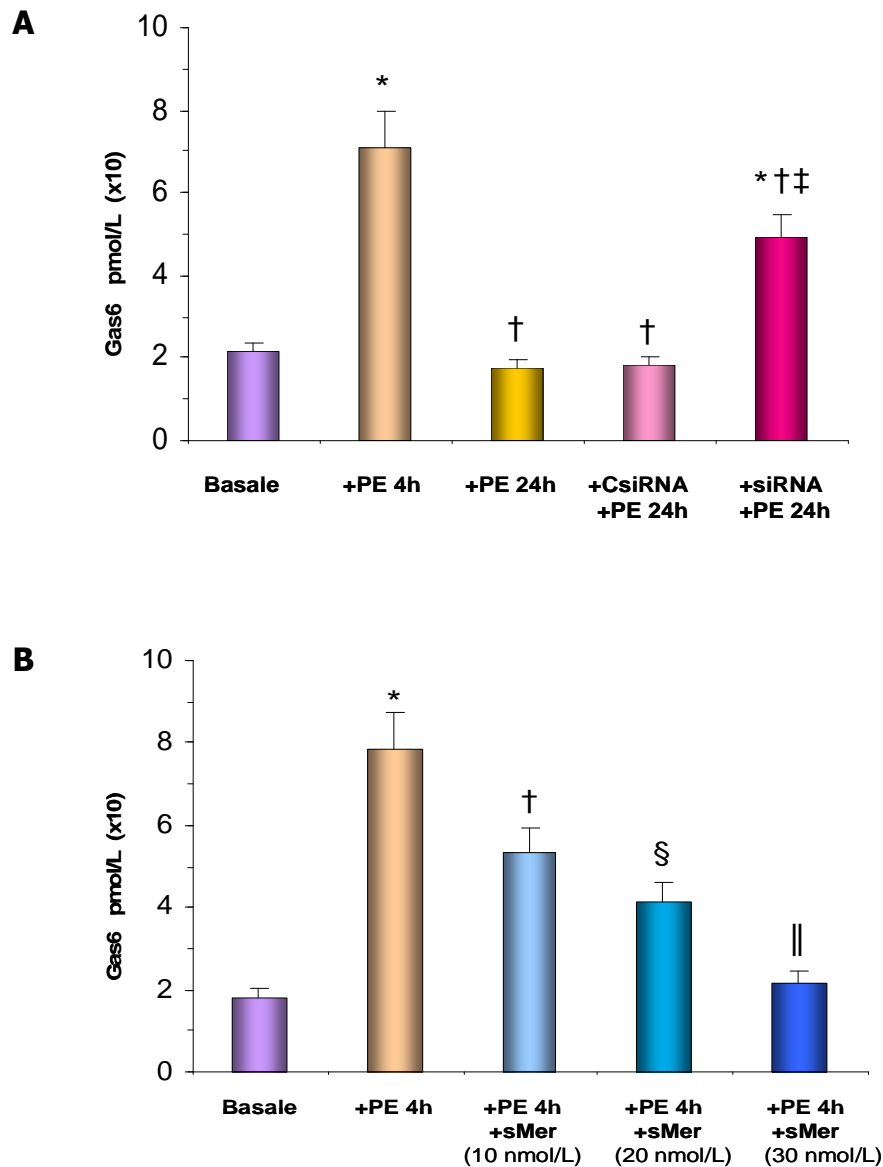


Figura 16. ELISA di GAS6 secreto nel medium di coltura di cellule THP-1

Legenda: (A) le cellule THP-1 silenziate e non silenziate sono state stimulate per 4 h e 24 h con PE;

(B) aggiunta dose-dipendente di sMer Fc Chimera ricombinante alle cellule THP-1 stimulate per 4 h con PE.

I dati rappresentano la media \pm deviazione standard delle misurazioni effettuate in triplicato in 6 diversi esperimenti.

* $p < 0.01$ versus cellule basali; † $p < 0.01$ versus cellule stimulate (+PE 4 h);

(A) ‡ $p < 0.01$ versus cellule stimulate, non silenziate (+CsiRNA +PE 24 h);

(B) § $p < 0.01$ versus cellule stimulate (+PE 4 h) + sMer (10 nmol/L); || $p < 0.01$ versus cellule stimulate (+PE 4 h) + sMer (20 nmol/L).

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio evidenziano come nelle placche aterosclerotiche umane, provenienti da pazienti sottoposti a TEA carotidea, le cellule apoptotiche siano presenti nell'area attorno al core lipidico, ricca di macrofagi, mentre nella porzione periferica della placca le cellule apoptotiche siano solo minimamente rappresentate. I nostri dati sono concordi con precedenti dimostrazioni che l'apoptosi dei macrofagi è un fenomeno che avviene in tutti gli stadi di progressione delle placche aterosclerotiche (29, 30). Tuttavia, mentre nelle lesioni precoci l'apoptosi dei macrofagi limita la cellularità e riduce la progressione della placca, nelle lesioni in fase avanzata la morte programmata dei macrofagi promuove lo sviluppo del core necrotico, un fattore chiave nella vulnerabilità della placca (6). Quindi i processi che favoriscono l'accumulo dei macrofagi nelle placche aterosclerotiche possono promuoverne l'espansione mentre quelli che lo riducono, come l'apoptosi accoppiata ad efferocitosi con successiva rimozione dei macrofagi, possono ritardarne la progressione. Nelle lesioni aterosclerotiche in fase avanzata l'apoptosi dei macrofagi è spesso accompagnata ad un'efferocitosi difettiva e di conseguenza con la morte dei macrofagi e la necrosi (12, 13). Ancora oggi non è nota la/le causa/e che determinano un'efferocitosi difettiva nelle placche in stadio avanzato. In questo contesto recenti evidenze *in vitro* ed in modelli animali indicano un ruolo della via di segnale GAS6-TAM nel processo di espansione del core necrotico (14, 16, 31).

Nel nostro studio abbiamo dimostrato che tra tutti i recettori TAM, solo Mertk è risultato significativamente più espresso nell'area attorno al core lipidico rispetto alla periferia della placca. Risultati sovrapponibili sono stati evidenziati anche per la metalloproteinasi ADAM17, ma non per la proteina ponte GAS6.

E' stato suggerito che il recettore Mertk possa rappresentare un importante regolatore di efferocitosi (14). Studi in modelli animali di aterosclerosi hanno dimostrato che nei topi chinasi-difettivi per Mertk e knockout ApoE (Mertk^{KD}, ApoE^{-/-}) lo sviluppo di placche aterosclerotiche più instabili rispetto ai controlli (topi knockout solo per ApoE^{-/-}) possa essere legato ad un'efferocitosi difettiva (32).

I risultati di questo studio evidenziano inoltre che, nonostante l'espressione genica sia di ADAM17 che di Mertk risulti più elevata nell'area attorno al core lipidico, vi è un gradiente opposto della loro espressione proteica dal bordo esterno del core lipidico verso il cappuccio fibroso. Infatti, la positività immunohistochimica per Mertk è decrescente dal primo quintile (più vicino al core lipidico), rispetto al quinto (verso il cappuccio fibroso), viceversa per ADAM17. La causa di questa espressione opposta di Mertk e ADAM17 nell'area attorno al core lipidico non è al momento chiarita. Alcuni studi in modelli animali mostrano che il recettore Mertk può essere clivato nel suo dominio extracellulare da ADAM17 (22). Quindi, sebbene sulla base di questi nostri risultati non possiamo trarre alcuna conclusione definitiva, un'ipotesi potrebbe essere che dove l'espressione di ADAM17 è massima, vi sia una riduzione del dominio extracellulare di Mertk, nonostante la sua aumentata espressione genica.

Abbiamo pertanto ipotizzato che l'area attorno al core lipidico possa essere un forte induttore di ADAM17, che clivando il dominio extracellulare di Mertk possa inattivare il recettore.

Questa ipotesi è supportata dai risultati che abbiamo ottenuto nello studio *in vitro* incubando le cellule THP-1 con PE, estratto da aree corrispondenti alle zone dove è stato evidenziato il gradiente di Mertk e ADAM17. I nostri risultati evidenziano l'aumento dell'espressione genica di entrambi Mertk e ADAM17, ma solo della proteina ADAM17. Al contrario l'espressione del dominio extracellulare di Mertk è aumentata dopo 4 h e ridotta dopo 24 h. Per spiegare questo risultato inaspettato, abbiamo ipotizzato che potesse essere dovuto al clivaggio del recettore da parte di ADAM17. La dimostrazione dell'aumento della concentrazione di sMer nel medium di coltura ha consentito di confermare la nostra ipotesi. Inoltre i nostri risultati mostrano che il silenziamento di ADAM17 riduce significativamente sMer, indicando che ADAM17 potrebbe essere uno dei determinanti nella formazione di sMer. Questa conclusione è supportata dalla dimostrazione che ADAM17 è l'unica metalloproteinasi responsabile del clivaggio del dominio extracellulare di Mertk e Axl (33).

Il ruolo di ADAM17, necessario fisiologicamente in diversi processi cellulari (12, 16, 34), non è ancora completamente chiarito nella progressione e nella rottura delle placche

aterosclerotiche (12, 16, 34). I pochi dati in letteratura in modelli animali di aterosclerosi sono contrastanti essendo stati associati sia all'instabilità della placca (34), che ad un effetto protettivo nella formazione delle placche (35).

Infine, i risultati di questo nostro studio dimostrano che l'aumento di sMer indotto da PE è associato con la formazione del complesso sMer-GAS6 nel medium di coltura e che sMer funziona da antagonista di Mertk full-length legando la proteina ponte GAS6, quindi inibendo la sua funzione di molecola ponte e quindi determinando efferocitosi difettiva. A supporto di tale ipotesi è la dimostrazione in modelli animali della riduzione del legame tra GAS6 e la fosfatidilserina esposta sulla membrana esterna delle cellule apoptotiche (18).

In conclusione i risultati di questo studio evidenziano che, nonostante l'espressione genica sia di ADAM17 che di Mertk risulti più elevata nell'area attorno al core lipidico, vi è un gradiente opposto della loro espressione proteica dal bordo esterno del core lipidico verso il cappuccio fibroso. La causa di questa diversa espressione non è al momento chiarita, anche se i nostri risultati indicano che l'area a ridosso del core lipidico sia un forte induttore di ADAM17, il quale potrebbe rilasciare il dominio extracellulare di Mertk con la formazione di sMer. I nostri risultati suggeriscono che l'inibizione di GAS6 da parte di sMer possa giocare un ruolo determinante nell'efferocitosi difettiva delle placche carotidee umane.

BIBLIOGRAFIA

1. Shah PK. Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 41: 15S-22S.
2. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92: 657-671.
3. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation.* 2005; 111: 3481-3488.
4. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 2: 115-126.
5. Mitchinson MJ, Hardwick SJ, Bennett MR. Cell death in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol.* 1996; 7(5): 324-9.
6. Seimon T, Tabas I. Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2009; 50: 382-387.
7. Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res.* 2000; 87(3): 184-8.
8. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26(4): 239-57.
9. Kavurma MM, Bhindi R, Lowe HC, Chesterman C, Khachigian LM. Vessel wall apoptosis and atherosclerotic plaque instability. *J Thromb Haemost.* 2005; 3(3): 465-72.
10. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998; 281(5381): 1309-12.
11. Mercer J, Mahmoudi M, Bennett M. DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease. *Mutat Res.* 2007; 621(1-2): 75-86.
12. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis. The importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25: 2255-2264.
13. Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability. *Cardiovasc Res.* 2007; 73: 470-480.
14. Thorp E, Tabas I. Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. *J Leukoc Biol.* 2009; 86: 1089-95.

15. Maderna P, Godson C. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2003; 141-151.
16. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev*. 2008; 8: 327-336.
17. Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Jenette JC, Roubey RA, Earp HS, Matsushima GK, Reap EA. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J Exp Med*. 2002; 196: 135-140.
18. Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, Mizuno K. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996; 271: 30022-30027.
19. Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, Matsushima GK. Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J Immunol*. 2007; 178: 5635-5642.
20. Lutgens E, Tjwa M, Garcia de Frutos P, Wijnands E, Beckers L, Dahlback B, Daemen M, Carmeliet P, Moons L. Genetic loss of GAS6 induces plaque stability in experimental atherosclerosis. *J Pathol*. 2008; 216: 55-63.
21. Sather S, Kenyon KD, Lefkowitz JB, Liang X, Varnum BC, Henson PM, Graham DK. A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood*. 2007; 109: 1026-1033.
22. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997; 385: 729-33.
23. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med*. 1991; 325: 445-453.
24. Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, Rankin RN, Clagett GP, Hachinski VC, Sackett DL, Thorpe KE, Meldrum HE, Spence JD. Benefit of carotid

- endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med.* 1998; 339: 1415-1425.
25. Randomised trial of endarterectomy for recently symptomatic carotid stenosis: final results of the MRC European Carotid Surgery Trial (ECST). *Lancet.* 1998; 351: 1379-1387.
26. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1262–1275.
27. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1177–1178.
28. Figueiredo ML, Kim Y, St John MA, Wong DT. p12CDK2-AP1 gene therapy strategy inhibits tumor growth in an in vivo mouse model of head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(10): 3939-48.
29. Kockx MM, De Meyer GR, Muhring J, Jacob W, Bult H. and Herman AG. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 1998; 97: 2307–2315.
30. Kockx MM and Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res.* 2000. 45: 736–746.
31. Bellido-Martin L, García de Frutos P. Vitamin K-dependent actions of GAS6. *Vitam Horm.* 2008; 78: 185–209.
32. Thorp E, Cui D, Schrijvers DM, Kuriakose G, Tabas I. MERTK receptor mutation reduces efferocytosis efficiency and promotes apoptotic cell accumulation and plaque necrosis in atherosclerotic lesions of apoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:1421-1428.
33. O'Bryan JP, Fridell YW, Koski R, Varnum B, Liu ET. The transforming receptor tyrosine kinase, Axl, is post-translationally regulated by proteolytic cleavage. *J Biol Chem.* 1995; 270: 551-557.

34. Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A. Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol.* 2002; 15: 439–446.
35. Holdt LM, Thiery J, Breslow JL, Teupser D. Increased ADAM17 mRNA expression and activity is associated with atherosclerosis resistance in LDL-receptor deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 1097-1103.