



**UNIVERSITÀ
DI SIENA**
1240

Scuola di Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare
Direttore: Prof.ssa Antonella Naldini
XXXIII ciclo

RELAZIONE DEL I ANNO DI CORSO

Supervisore (Tutor):
Prof.ssa Antonella Naldini

Dottorando:
Dott.ssa Sara Monaci

A.A. 2017/2018

Dott.ssa Sara Monaci
e-mail: sara.monaci@student.unisi.it
Via A. Moro 2-53100 Siena (Italia)
Tel: +39 0577/234216

Durante il primo anno di corso di dottorato di ricerca, ho cercato di assimilare le tecniche ed i protocolli messi a disposizione del laboratorio. In particolare, ho utilizzato le tecniche finalizzate allo sviluppo del mio progetto che si basa sullo studio delle cellule dendritiche e l'ambiente ipossico.

INTRODUZIONE

Le cellule dendritiche (DCs) sono cellule che originano principalmente dai precursori della linea mieloide e hanno progenitori comuni a monociti, macrofagi e polimorfonucleati (Liu and Nussenzweig, 2010). Le DC costituiscono un insieme unico di cellule capace di indurre le risposte immunitarie primarie e sono, infatti, cellule presentanti l'antigene situate nei tessuti periferici primari (timo, midollo osso), secondari (linfonodi e milza) e negli organi linfoidi. La loro funzione è quella di catturare il materiale antigenico nella periferia e trasportarlo negli organi linfoidi, dove lo presenteranno alle cellule T naive che popolano il linfonodo (Steinman, 1998).

Le DC presentano numerosi recettori che sono capaci di individuare i segnali di “pericolo” nei microambienti in cui risiedono. Le vie molecolari associate alla presenza di patogeni, citochine pro-infiammatorie o prodotti tissutali rilasciati da tessuti danneggiati promuovono la maturazione delle DC mediante cambiamenti fenotipici che promuovono la proliferazione delle cellule T naive e di quelle della memoria. Invece in assenza di segnali infiammatori le DC catturano e presentano antigeni *self*, ma rimangono fenotipicamente non attive. In questo contesto i linfociti T non proliferano e presentano una reattività anergica, che è responsabile almeno in parte della tolleranza periferica (Granucci et al., 2005).

Le DCs pertanto si presentano in due stati funzionali differenti che riflettono capacità e ruoli distinti: esistono, infatti, cellule dendritiche immature (iDCs) e cellule dendritiche mature (maDCs). Le iDCs sono, a tutti gli effetti, cellule differenziate e il loro ruolo preponderante è quello di vigilare sui tessuti periferici, di migrare nelle aree con processi infiammatori in atto e fagocitare gli agenti estranei per l’acquisizione degli antigeni e sono in grado di attivare i linfociti T. Tuttavia quest’ultima capacità è ridotta a causa della minor espressione, rispetto alle cellule mature, di molecole costimolatorie come CD80 e CD86 (Mellman and Steinman, 2001).

Il processo di maturazione delle DCs ha inizio con il riconoscimento dei PAMPs da parte dei TLRs ed il conseguente innesco della trasduzione del segnale che porta ad attivazione di fattori trascrizionali come NFkB (Kanzler et al., 2007). I cambiamenti significativi nelle maDCs sono: l’aumento temporaneo del tasso di endocitosi e macropinocitosi, che si riduce, però, drasticamente poco dopo

(Weck et al., 2007), l'acidificazione dei compartimenti endosomiali e lisosomiali, l'attivazione delle catepsine e la formazione dell'immunoproteasoma (Kloetzel and Ossendorp, 2004; Realini et al., 1994; Siddiqui et al., 2011). Le maDCs, inoltre, espongono marcatori di superficie differenti rispetto alle iDCs; infatti i recettori per le chemochine pro-infiammatorie sono down-regolati (Sallusto et al., 1998), mentre aumenta l'espressione del CCR7 (per la migrazione linfonodale) (Watarai et al., 2005). L'ipossia è una condizione comune sia in fisiologia, come nello sviluppo embrionale e nei tessuti linfoidi, che in processi patologici come l'infiammazione, l'angiogenesi e la progressione tumorale. È quindi evidente che l'ipossia possa condizionare la risposta di cellule immunocompetenti (e quindi la modulazione del sistema immunitario), e di cellule tumorali e stromali, con importanti conseguenze nella progettazione di vaccini e di terapie antitumorali.

Sapendo che solitamente le cellule dendritiche si trovano a svolgere le proprie funzioni in condizioni di ipossia, una caratteristica degli organi linfoidi primari e secondari, abbiamo investigato i meccanismi molecolari coinvolti nella sopravvivenza cellulare e nell'apoptosi, ponendo particolare attenzione alla differenza tra cellule dendritiche immature e immature sottoposte ad ambiente ipossico

MATERIALI E METODI

Isolamento di monociti da sangue periferico

Differenziamento di monociti in cellule dendritiche

Colture cellulari primarie

Colture cellulari immortalizzate in adesione e in sospensione

Saggi di proliferazione cellulare quali la camera di Bürker, CyQUANT Cell Proliferation Assay,

Saggio di riduzione della resazurina

Estrazione di proteine, RNA e miRNA da colture cellulari

Dosaggio di proteine e RNA

Retrotrascrizione ed amplificazione di acidi nucleici (qRT-PCR)

Elettroforesi su gel d'agarosio

Western blot con utilizzo di ChemiDoc XRS (BIORAD)

Immunofluorescenza

Camera di Boyden

Utilizzo del microscopio ottico ed a fluorescenza

Uso della camera ipossica

RISULTATI

I risultati ottenuti finora, mostrano una diversa risposta di adattamento da parte delle cellule dendritiche a seconda che la loro maturazione sia avvenuta in condizioni normossiche o in condizioni ipossiche (2% O₂), tipiche degli organi linfoidi primari e secondari. La maturazione in condizioni di ipossia, evidenzia in maniera significativa, l'accumulo del fattore trascrizionale indotto dall'ipossia HIF-1α, se paragonato a quello delle cellule matureate in normossia. Inoltre, saggi di vitalità cellulare dimostrano come le cellule dendritiche matureate in ipossia siano più resistenti all'insulto ipossico e come la maturazione mediante LPS, conferisca un fenotipo autofagico a tali cellule, proteggendole dalla morte cellulare indotta dall'ipossia. Questi dati sono supportati dall'analisi di fattori coinvolti nella sopravvivenza cellulare, in quanto la loro espressione non appare drasticamente ridotta quando le cellule dendritiche mature vengono esposte ad ambienti ipossici.

Ulteriori studi sono necessari per comprendere la fisiologia delle cellule dendritiche e come tali cellule possano indurre una maggiore risposta linfocitaria, soprattutto se si pone l'attenzione su vaccini antitumorali basati sull'utilizzo di cellule dendritiche.

ELENCO SEMINARI SEGUITI

- 21 novembre 2017 “Aggiornamento su legislazione in materia di sperimentazione animale” Università Degli Studi di Siena, Prof. Giacomo Matteucci
- 23 novembre 2017 “Oncologia a 360 gradi” Università Degli studi di Siena. Prof Maurizio Orlandini, Prof.ssa Monica Bocchia, Prof.ssa Stefania Butini
- 27 novembre 2017 “Seconda adunanza scientifica” Università Degli Studi di Siena, Accademia dei Fisiocritici
- 1 dicembre 2017 “Varie tipologie di stabulari. Aree funzionali ed organizzazione degli stabulari. Attrezzature per piccoli animali Le cappe chimiche e biologiche. La protezione dell'operatore nelle operazioni di cambio e manipolazione degli animali Zebrafish: utilizzo in ricerca, mantenimento e stabulazione di una colonia” Università Degli Studi di Siena, Prof. Giacomo Matteucci

- 2 dicembre 2017 “Investigation of metabolism by metabolomics methods” Università Degli Studi di Siena. Prof. Plotr Mlynarz, Department of Chemistry Wroclaw University of Science and Technology
- 12 dicembre 2017 “Targeting hypoxia-sensitive pathways in inflammatory bowel disease” Università Degli Studi di Siena. Prof. Cormac Thomas Taylor, University College Dublin
- 27 marzo 2018 webinar “How to use CRISP-Cas9 for knockout, knockin and gene activation”, speaker Amanda Haas, Horizon.
- 3 maggio 2018 “ Vaccines save lives” , Università degli Studi di Siena, Prof. Emanuele Montomoli, Università degli Studi di Siena School of Pharmacy
- 17 maggio 2018 “The lysosome as a signaling hub”, Università degli Studi di Siena, Prof. Andrea Ballabio, director of TGEM, Professor of Medical Genetics University of Naples “Federico II”, Italy.
- 12 giugno 2018 “Nuove tecniche ottiche per lo studio della fisiologia e fisiopatologia cardiaca”, Università degli Studi di Siena. Prof. Leonardo Sacconi, Istituto Nazionale di Ottica- Consiglio Nazionale delle Ricerche (INO-CNR) Università degli Studi di Firenze
- 10 luglio 2018 webinar Bio Rad “ Mastering the Art and Science of Western Blotting” dal titolo "Best Practices for the Best Western Blots" Paul Liu, PhD, Product Manager, Western Blot Reagents and Devices, Protein Quantitation Marketing
- 12 settembre 2018 workshop “Extracellular Vesicles, a breakthrough in precision medicine and nanotechnology”. Horizon 2020, Florence.
- 24 settembre 2018 “The crosstalk between blood platelets and cancer: novel molecular mechanisms and functional consequences” Università degli Studi di Siena, Dr. Gianni Guidetti, Department of Biology and Biotechnology University of Pavia

BIBLIOGRAFIA

- Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245252.
- Granucci F, Foti M, Ricciardi-Castagnoli P (2005) Dendritic cell biology. *Advances in Immunology* 88:193-233.
- Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M., & Coffman, R. L. (2007). Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine*, 13(5), 552-55
- Kloetzel, P. M., & Ossendorp, F. (2004). Proteasome and peptidase function in MHC class-I-mediated antigen presentation. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 76-8
- Liu, K., & Nussenzweig, M. C. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews*, 234(1), 45-54.
- Mellman, I., & Steinman, R. M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106(3), 255-258.
- Realini, C., Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K., et al. (1994). Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. *Journal of Biological Chemistry*, 269(32), 20727-20732.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., et al. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology*, 28(9), 2760-2769.
- Siddiqui, S., Alatery, A., Kus, A., & Basta, S. (2011). TLR engagement prior to virus infection influences MHC-I antigen presentation in an epitope-dependent manner as a result of nitric oxide release. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(3), 457-468
- Watarai, H., Hinohara, A., Nagafune, J., Nakayama, T., et al. (2005). Plasma membrane-focused proteomics: dramatic changes in surface expression during the maturation of human dendritic cells. *Proteomics*, 5(15), 4001-4011.

- Weck, M. M., Grünebach, F., Werth, D., Sinzger, C., et al. (2007). TLR ligands differentially affect uptake and presentation of cellular antigens. *Blood*, 109(9), 3890-389

Prof. Antonella Naldini

Dott.ssa Sara Monaci

Dott.ssa Sara Monaci
e-mail: sara.monaci@student.unisi.it
Via A. Moro 2-53100 Siena (Italia)
Tel: +39 0577/234216