

SRP/22

1061604

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Dipartimento di Fisiologia e Patologia Università di Trieste

DOTTORATO DI RICERCA IN PATOLOGIA SPERIMENTALE E CLINICA

XVII CICLO

**INTERAZIONE COMPLEMENTO-ENDOTELIO
NELLA FLOGOSI**

Dott.ssa Fleur BOSSI ^{LYS}
es

* *Coordinatore:*
Prof. Pierluigi Patriarca

Tutore:
Prof. Francesco Tedesco



| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUZIONE | 2 |
| 1.1 | IL COMPLEMENTO | 3 |
| 1.2 | L'ENDOTELIO..... | 6 |
| 1.3 | RAPPORTI TRA ENDOTELIO E SISTEMA DEL COMPLEMENTO | 11 |
| 1.3.1 | <i>Effetti indotti dai prodotti di attivazione del C sulle EC</i> | <i>11</i> |
| 1.3.2 | <i>Sintesi dei componenti complementari da parte delle EC.....</i> | <i>14</i> |
| 2 | SCOPO DELLA RICERCA..... | 16 |
| 3 | PARTE PRIMA | 19 |
| 4 | PARTE SECONDA | 27 |
| 4.1 | PREMESSA | 28 |
| 4.2 | MATERIALI E METODI..... | 29 |
| 4.2.1 | <i>Isolamento delle cellule endoteliali da cordoni ombelicali umani (HUVEC).....</i> | <i>29</i> |
| 4.2.2 | <i>Isolamento di cellule endoteliali dal microcircolo cutaneo (ADMEC).....</i> | <i>30</i> |
| 4.2.3 | <i>Isolamento di cellule endoteliali dalla decidua (DEC).....</i> | <i>31</i> |
| 4.2.4 | <i>Allestimento di colture di cellule endoteliali</i> | <i>34</i> |
| 4.2.5 | <i>Preparazione del C5b6.....</i> | <i>35</i> |
| 4.2.6 | <i>Preparazione dell'iTCC e del SC5b-9.....</i> | <i>36</i> |
| 4.2.7 | <i>Dosaggio delle proteine.....</i> | <i>37</i> |
| 4.2.8 | <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....</i> | <i>37</i> |
| 4.2.9 | <i>Biotinilazione delle IgG.....</i> | <i>38</i> |
| 4.2.10 | <i>ELISA su HUVEC.....</i> | <i>39</i> |
| 4.2.11 | <i>Immunofluorescenza.....</i> | <i>40</i> |
| 4.2.12 | <i>Microscopia Elettronica a Trasmissione (TEM).....</i> | <i>40</i> |
| 4.2.13 | <i>Immunoistochimica su sezioni congelate.....</i> | <i>41</i> |
| 4.2.14 | <i>Biotinilazione della membrana delle HUVEC</i> | <i>43</i> |
| 4.2.15 | <i>Purificazione mediante colonna cromatografica di affinità'.....</i> | <i>43</i> |
| 4.2.16 | <i>SDS-PAGE ed immunoblotting</i> | <i>44</i> |
| 4.2.17 | <i>Acid strip.....</i> | <i>45</i> |
| 4.2.18 | <i>Valutazione della produzione di IL-8.....</i> | <i>45</i> |
| 4.2.19 | <i>Valutazione in vitro della permeabilità endoteliale</i> | <i>46</i> |
| 4.2.20 | <i>Analisi Statistica.....</i> | <i>46</i> |
| 4.3 | RISULTATI | 47 |
| 4.3.1 | <i>Produzione e presenza del C7 sulla membrana delle HUVEC.....</i> | <i>47</i> |
| 4.3.2 | <i>Presenza del C7 in diversi distretti tissutali</i> | <i>51</i> |
| 4.3.3 | <i>Purificazione e caratterizzazione del C7 espresso sulla membrana.....</i> | <i>53</i> |
| 4.3.4 | <i>Il C7 è covalentemente legato alla membrana delle HUVEC.....</i> | <i>54</i> |
| 4.3.5 | <i>Modulazione dell'espressione del C7 di membrana e del C7 solubile da parte di citochine.....</i> | <i>55</i> |
| 4.3.6 | <i>Il C7 di membrana contribuisce alla formazione del complesso terminale</i> | <i>57</i> |
| 4.3.7 | <i>Il C7 di membrana funge da "decoy acceptor" per gli altri componenti terminali59</i> | |
| 4.4 | DISCUSSIONE..... | 63 |
| 5 | CONCLUSIONI | 69 |
| 6 | BIBLIOGRAFIA | 71 |

1 INTRODUZIONE

1.1 IL COMPLEMENTO

Il sistema del complemento (C) è un componente dell'immunità naturale, che svolge un ruolo essenziale nella difesa contro agenti infettivi e nella rimozione degli immunocomplessi, e rappresenta un importante mediatore del processo flogistico [1].

Il sistema del C è composto da più di 30 proteine, tra componenti e regolatori, presenti nel plasma ed in altri liquidi biologici oppure legati alle membrane sia di cellule del sangue che di altri tessuti.

I componenti del C sono molecole solubili che si attivano sequenzialmente per un processo di proteolisi limitata, dando origine ad enzimi che scindono i componenti successivi, secondo un meccanismo di attivazione a cascata.

L'attivazione della sequenza complementare può avvenire essenzialmente attraverso tre vie: la via classica, che dipende dall'interazione del C1q con gli immunocomplessi o con aggregati immunoglobulinici; la via lectinica, che si attiva in seguito all'interazione della MBL (mannose-binding lectin) con strutture ricche di mannosio [2]; la via alternativa, che può essere attivata da numerose sostanze localizzate sulla superficie di batteri (LPS), funghi (zymosan), virus e parassiti, da prodotti di degradazione cellulare (enzimi lisosomiali), da enzimi della coagulazione e della fibrinolisi (trombina e plasmina) o può attivarsi spontaneamente (tickover).

Tutte e tre le vie di attivazione del C portano prima all'attivazione del C3 e, successivamente, tramite la produzione del C3b, alla formazione delle C5 convertasi, che danno avvio all'attivazione dei componenti terminali del sistema del C.

La C5 convertasi lega il C5 e provoca il distacco del frammento C5a, di dimensioni minori, mentre il C5b, di dimensioni maggiori, espone il sito di legame per i componenti successivi. Il C5b è particolarmente instabile e viene inattivato in meno di 2 minuti se non viene stabilizzato dal legame con il C6. Quando il C5b6 si lega al C7, il complesso va incontro ad una transizione

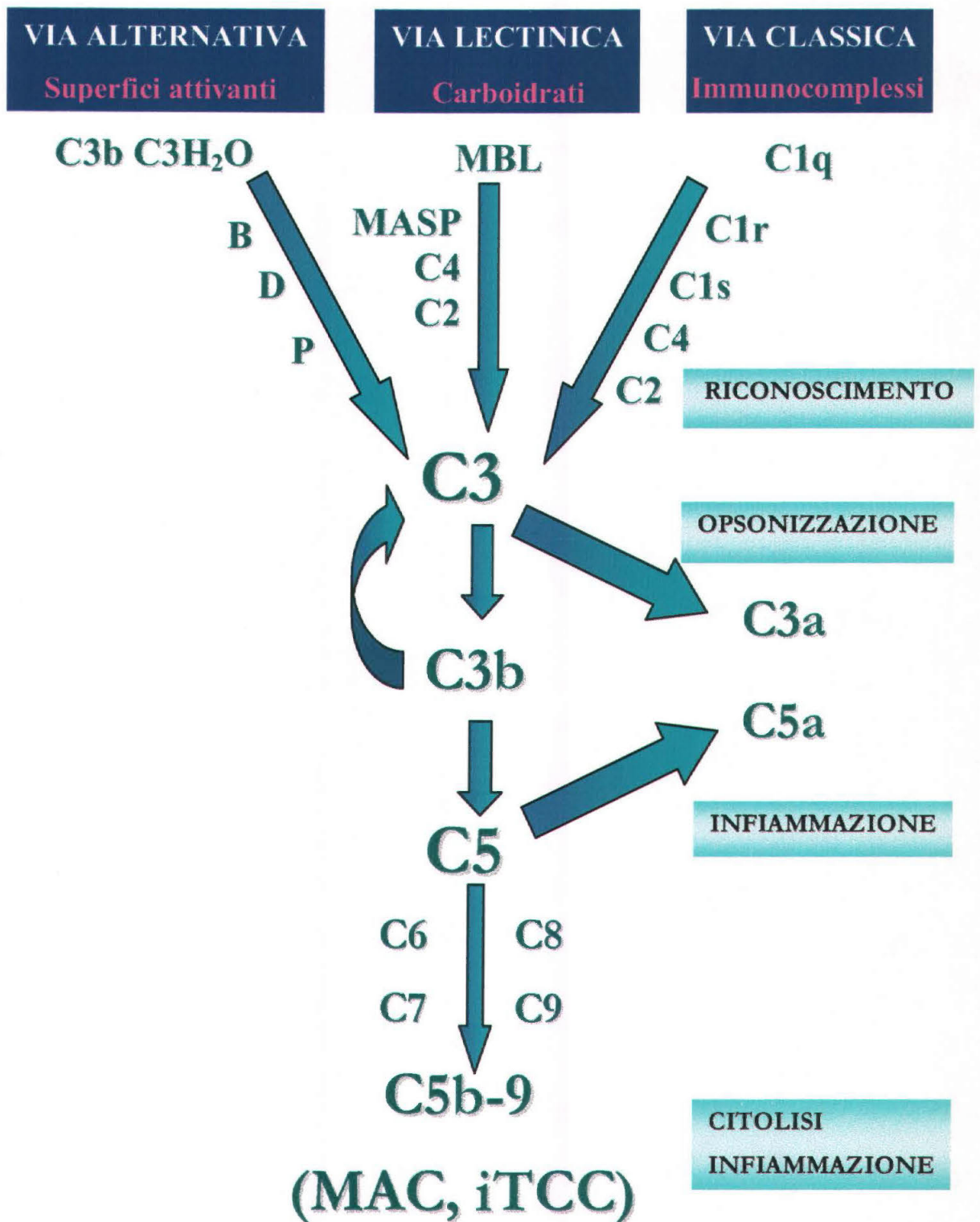
strutturale idrofilica-anfifilica per cui, per alcuni millisecondi, espone siti di legame per i fosfolipidi di membrana. Il complesso C5b67 che si forma sulla membrana di una cellula bersaglio si inserisce nel doppio strato lipidico e lega il C8 e più molecole di C9, che polimerizzano formando il MAC (Membrane Attack Complex). Il complesso penetra ulteriormente nel doppio strato lipidico e produce un poro transmembranario che causa la lisi del bersaglio.

Se la reazione avviene in fase fluida, il C5b7 perde rapidamente la capacità di legarsi a membrane cellulari attraverso il sito idrofobico e diffonde nel microambiente, mantenendo la capacità di legare i successivi componenti terminali C8 e C9. Si forma così un complesso terminale citotolicamente inattivo (iTCC) [3]. Il complesso terminale che si trova in circolo, in seguito alla attivazione del sistema, viene più frequentemente definito **SC5b-9**, in quanto presenta anche la proteina S o vitronectina [4].

Le cellule nucleate sono meno suscettibili alla lisi C-mediata rispetto a bersagli metabolicamente inerti come gli eritrociti, in quanto sono in grado di riparare le lesioni causate dal MAC e di liberarsene con meccanismi attivi di vescicolazione [5]. Tale osservazione ha fatto supporre che il MAC possa assemblarsi sulle cellule dell'ospite in quantità non sufficiente a causarne la lisi ma capace di attivarle.

In generale, il sistema complementare svolge funzioni di difesa attraverso molteplici attività biologiche, legate a vari prodotti di attivazione che vengono liberati nel corso della sequenza complementare. Un compito importante è quello opsonizzante, per cui il C3b ed il C3bi, vale a dire il C3b inattivato, si legano ai bersagli da eliminare favorendo il loro riconoscimento da parte dei fagociti provvisti di recettori specifici. Il MAC può attaccare direttamente il bersaglio lisandolo, ma questo meccanismo di difesa non è sempre efficiente. Il complemento può anche contribuire ai processi di difesa promuovendo la flogosi e coinvolgendo in questo modo altre cellule nella neutralizzazione del bersaglio, e più precisamente i fagociti e le cellule endoteliali. Esamineremo

qui di seguito le interazioni che i componenti terminali del sistema stabiliscono con le cellule endoteliali (EC).

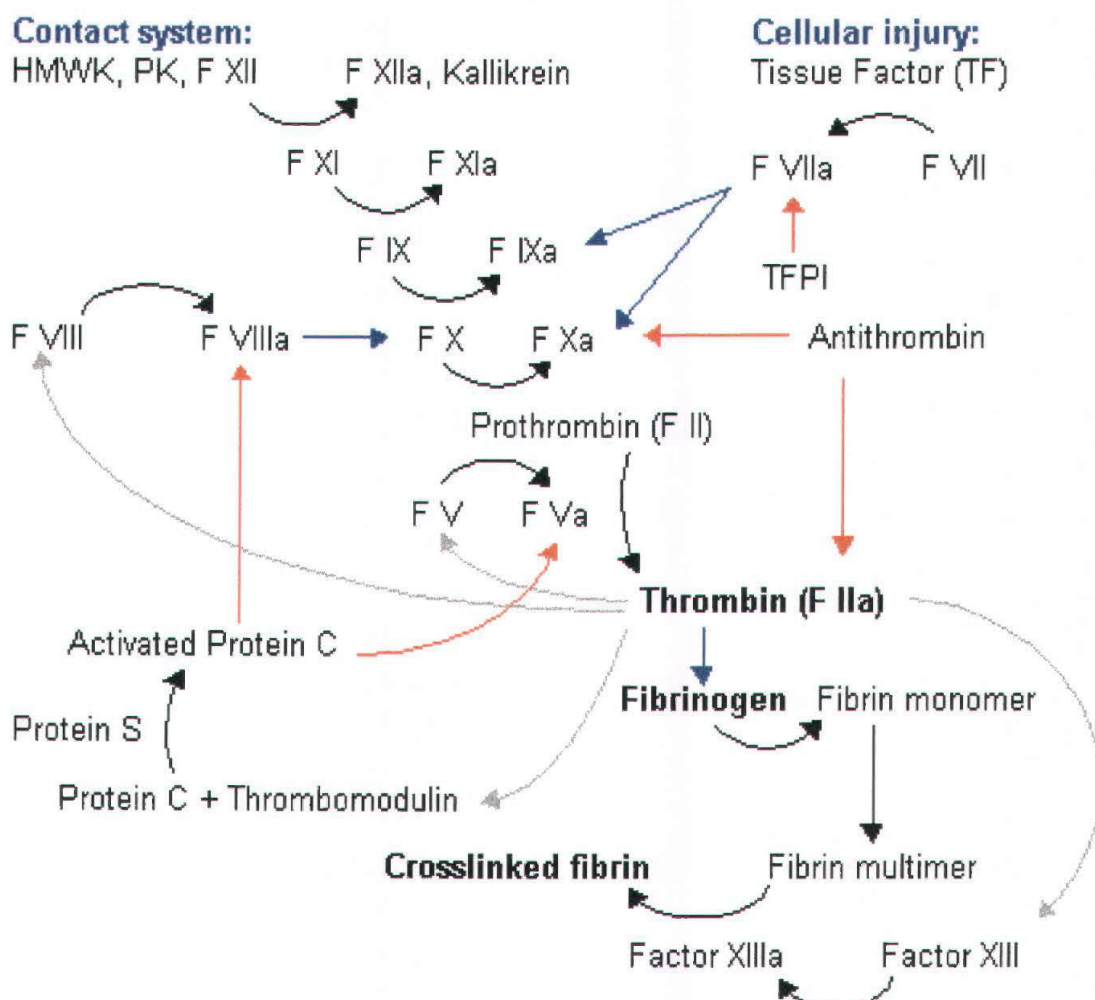


Rappresentazione schematica della cascata complementare.

1.2 L'ENDOTELIO

L'endotelio riveste la parete interna dei vasi [6] ed il suo compito non è solo quello di fungere da barriera tra il sangue circolante ed i tessuti circostanti ma anche di regolare il flusso sanguigno nei diversi territori. L'endotelio inoltre inibisce il processo della coagulazione, controlla la diffusione di molecole e la fuoriuscita di cellule dal lume verso siti extravascolari [7]. Le EC hanno la capacità di rispondere prontamente a cambiamenti fisico-chimici che avvengono nel torrente circolatorio o nei tessuti, esprimendo sulla loro membrana nuove molecole o modificando l'organizzazione strutturale delle giunzioni cellulari. Condizioni patologiche, come i processi infiammatori, possono infatti alterare le funzioni fisiologiche dell'endotelio e promuovere la migrazione transendoteliale delle cellule ed alterare la permeabilità vascolare. Le EC giocano un ruolo essenziale nel mantenere costante il flusso sanguigno producendo sostanze che modificano il tono vascolare e promuovono il rilassamento delle cellule muscolari lisce vascolari, come l'NO e PGI₂ [6]. L'endotelio contribuisce anche al regolare flusso sanguigno costituendo una superficie anti-trombotica. Infatti secerne e presenta sulla membrana numerose molecole che inibiscono la coagulazione e promuovono la fibrinolisi. Una di queste è la trombomodulina, che ha attività anticoagulante, essa circola complessata con la trombina [8] inducendo un cambiamento conformazionale in quest'ultima che porta all'attivazione della proteina C. L'attività della proteina C è incrementata dal legame con la proteina S, prodotta dall'endotelio, e agisce inibendo la coagulazione inattivando i fattori V e VIII. Le EC producono anche gli eparansolfati che vengono rilasciati nella matrice extracellulare oppure rimangono sulla superficie cellulare formando uno strato anticoagulante, in quanto legano ed attivano l'antitrombina III, che inibisce principalmente la trombina [9]. L'endotelio inibisce l'attivazione della cascata coagulativa anche producendo l'inibitore

del tissue factor (TFPI), che blocca il fattore X attivato presente nel complesso tissue factor-fattore VII attivato e fattore X attivato [10].



Schema della cascata coagulativa.

Anche l'integrità fisica dell'endotelio è un fattore importante, in quanto impedisce il contatto dei fattori plasmatici della coagulazione e le piastrine con la matrice sottoendoteliale, che porterebbe all'attivazione del processo della coagulazione. E' stato dimostrato che le EC sono capaci di sintetizzare "in vitro" l'attivatore tissutale del plasminogeno (t-PA), che regola la fibrinolisi e mantiene il sangue in uno stato fluido [6]. Tuttavia alcune perturbazioni dell'endotelio possono indurre il cambio di stato da antitrombotico a protrombotico, uno dei fattori maggiormente coinvolti in questo fenomeno è la produzione del Tissue Factor (TF) da parte delle EC

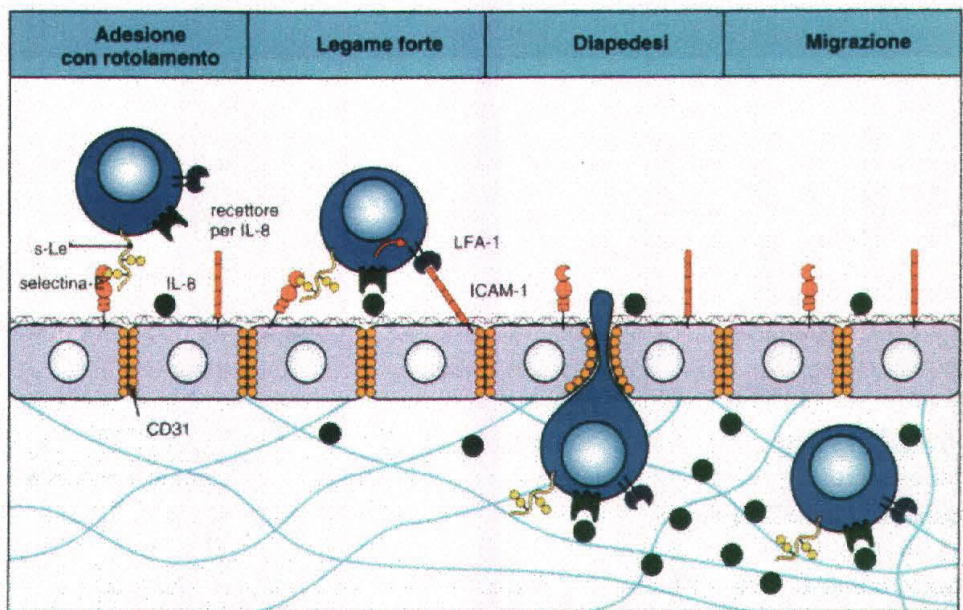
attivate [11]. Il TF si lega al fattore VII attivato che attiva a sua volta il fattore X e si viene a formare un complesso tra il fattore X attivato, il fattore V attivato e i fosfolipidi della membrana. Tale complesso, noto come protrombinasi, converte la protrombina in trombina. Le EC partecipano alla coagulazione producendo anche l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) [12].

Le EC esercitano anche un ruolo importante nella regolazione del traffico cellulare dal compartimento intravascolare ai tessuti periferici. In condizioni fisiologiche l'endotelio forma una barriera fisica impedendo che i leucociti circolanti escano dal torrente circolatorio, fanno eccezione alcuni organi, come il tessuto linfatico, in cui i leucociti possono fuoriuscire liberamente dai vasi a livello delle venule post-capillari. Tuttavia, in seguito ad attivazione da parte di stimoli proinfiammatori, che possono agire sia dal lato intravascolare sia da quello extravascolare, le EC vengono attivate e presentano cambiamenti strutturali e funzionali. In particolare, le EC permettono l'extravasazione dei leucociti che passano attraverso le giunzioni intercellulari e raggiungono i tessuti. La migrazione dei leucociti verso i tessuti sede del processo infiammatorio è un fenomeno composto da più fasi che coinvolge l'interazione tra i leucociti, principalmente i neutrofili, e le molecole di adesione presenti sulle EC [13], come descritto nella tabella sottostante.

La migrazione transendoteliale avviene a livello delle venule post-capillari ed inizia con la marginazione dei leucociti che cominciano a rallentare ed a rotolare sulla superficie endoteliale (rolling). A questa fase segue un'adesione stabile delle cellule che stabiliscono un contatto più stretto con l'endotelio (firm adhesion). Successivamente, i leucociti cominciano a muoversi lungo la superficie endoteliale, cambiano forma ed emettono pseudopodi, che si inseriscono tra le giunzioni delle cellule endoteliali dando avvio al fenomeno della "diapedesi". Un ruolo importante in questo processo è svolto da fattori chemiotattici, che richiamano i leucociti formando un gradiente. Le cellule

rimodellano il loro citoscheletro e si muovono in direzione del gradiente crescente del fattore chemiotattico.

| | Rolling | Adesione Stabile | Diapedesi | Migrazione |
|------------|--|-------------------------|------------------|---|
| Neutrofilo | Sle ^x L-selectina | Integrine β_2 | PECAM-1 | Integrine β_1 e β_2 CD44 |
| Endotelio | P-selectina E-selectina L-selectina ligand CD34 | ICAM-1 ICAM-2 | PECAM-1 | Chemochine |



Il fenomeno della transmigrazione avviene grazie alla modificazione delle molecole di adesione sulle cellule endoteliali e leucocitarie. Per quanto riguarda l'endotelio predominano i cambiamenti quantitativi mentre per i leucociti sono più importanti le alterazioni qualitative [14]. Ogni fase della migrazione coinvolge diversi tipi di molecole d'adesione; nel "rolling" sono coinvolte le selectine mentre nell'adesione e nella diapedesi operano le integrine e le molecole appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline [15].

Il primo legame tra l'endotelio ed i leucociti e la fase di rolling avviene grazie ad un gruppo di molecole chiamate selectine, che sono presenti sulle EC. La selectina P è la prima ad essere presentata sulla membrana e compare pochi minuti dopo il contatto con lo stimolo, mentre la E-selectina (ELAM) richiede dalle 4 alle 6 ore per la sua presentazione sulla superficie cellulare [16]. Entrambi i tipi molecolari interagiscono con il ligando espresso sui leucociti, il carboidrato sialyl Lewis x. I leucociti, in seguito al contatto con le EC e le chemochine rilasciate dall'endotelio stesso, esprimono sulla loro membrana cellulare numerose molecole di integrine β_2 che riconoscono altre molecole presenti sulle EC, alcune sono costitutive, come la Intercellular Cell Adhesion Molecule (ICAM-2), e altre sono esposte solo dopo la stimolazione (ICAM-1). L'interazione tra questi due gruppi di molecole permette un'adesione ferma che porta poi al passaggio dei leucociti attraverso le giunzioni interendoteliali. Il movimento direzionale dei leucociti è mediato dall'interazione omotipica tra le molecole di PECAM-1 presenti sia su queste cellule che a livello delle giunzioni tra le EC, e dall'azione delle molecole rilasciate dalle EC, come l'IL-8, o che rimangono associate alla membrana cellulare, come il Platelets Activating Factor (PAF) [14]. E' stato inoltre dimostrato che, oltre al PECAM-1, anche la VE-caderina è importante per la extravasazione dei leucociti [17-19].

1.3 RAPPORTI TRA ENDOTELIO E SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Numerose molecole circolanti nel sangue possono interagire con l'endotelio portando all'attivazione della cascata della coagulazione o all'insorgenza dei fenomeni proinfiammatori. Tra le molecole che possono reagire con le EC ci sono anche i prodotti di attivazione del sistema del C. I componenti di tale sistema possono prendere contatto con l'endotelio sia dalla parte luminale che da quella abluminale, infatti la maggior parte dei componenti è sintetizzata dal fegato e rilasciata nel sangue, ma è noto che alcune molecole possono essere secrete anche dai macrofagi e dai fibroblasti nei tessuti. Più recentemente è stato dimostrato che anche le EC possono sintetizzare e secernere componenti del sistema.

Il legame di componenti complementari alle EC può indurre cambiamenti strutturali e funzionali caratterizzati dalla contrazione cellulare, espressione di molecole di adesione e fattori procoagulanti, rilascio di chemochine e modificazione del tono vascolare. Questi cambiamenti sono molto simili a quelli causati da altri stimoli proinfiammatori come citochine o LPS. Le modificazioni endoteliali possono essere transienti e localizzate e riflettono la capacità delle cellule di adattarsi ad ogni tipo di perturbazione presente nel tessuto circostante. In alcune situazioni l'attivazione delle EC causata dal C può diventare persistente ed incontrollata portando a cambiamenti sostanziali che inducono alterazioni dei vasi.

1.3.1 EFFETTI INDOTTI DAI PRODOTTI DI ATTIVAZIONE DEL C SULLE EC

Le EC offrono numerosi siti di legame per i componenti attivati del C. Le EC possono interagire con il C1q in modo indipendente dagli altri componenti mediante un recettore di membrana. Fino ad oggi sono stati scoperti tre recettori presenti sulle EC capaci di riconoscere diverse porzioni del C1q. Uno di questi, il C1qR(P), riconosce la parte collagenica ed è una molecola transmembrana di tipo I, ed è il maggior candidato a riconoscere e legare il

C1q libero in seguito all'attivazione del sistema "in vivo" [20, 21]. La parte collagenica del C1q è riconosciuta anche da un altro recettore, il cC1qR o calreticulina [22], mentre la parte globulare interagisce con il recettore gC1q [23]. Il C1q attivato stimola l'endotelio ad esprimere E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 e promuove l'adesione dei leucociti [24] mentre l'interazione del C1q con i recettori presenti sulle EC induce il rilascio di IL-8, IL-6 ed MCP-1. Questi dati suggeriscono che il C1q contribuisce a mantenere l'infiammazione, ma le EC possono controllare l'attivazione del C aumentando l'espressione dei recettori per il C1q quando stimulate con citochine proinfiammatorie [25, 26]. Il sistema del C è collegato alla coagulazione e uno di questi punti d'incontro è rappresentato dal recettore per la parte globulare del C1q (gC1qR) che è capace di legare anche il chininogeno ad alto peso molecolare ed il fattore XII [27].

Studi recenti hanno dimostrato che anche la mannose binding lectin (MBL), una lectina calcio dipendente che riconosce il mannosio e la N-acetilglucosamina presente su batteri, funghi e altri agenti infettivi, è capace di legarsi alle EC; tuttavia sembra che il legame non avvenga in condizioni fisiologiche ma durante l'ipossia [28].

I prodotti dell'attivazione del C possono anche influenzare la migrazione transendoteliale dei leucociti attraverso le giunzioni intercellulari. Infatti il complesso C5b67 induce la retrazione delle cellule endoteliali [29], può trasmettere un segnale di attivazione cellulare inducendo l'influsso di Ca^{2+} nei neutrofili, ed è chemiotattico per i granulociti neutrofili ed eosinofili [30].

E' stato dimostrato che le HUVEC (Human Umbelical Vein Endothelial Cells) possono legare anche il C5a e che esprimono il recettore per questo frammento in modo non dipendente dalla stimolazione con citochine [31]. Oltre alle HUVEC si è visto che il recettore del C5a viene espresso anche dalle EC del polmone e del cervello, e in quest'ultimo solo durante i processi infiammatori [32, 33]. L'interazione del C5a con le EC porta all'espressione

della P-selectina e all'adesione dei neutrofilii. Ogni fase dell'interazione tra leucociti e cellule endoteliali può essere infatti influenzata dal C5a e dal complesso terminale in forma sublitica ed in forma citoliticamente inattiva (iTCC).

Sia il C5a che il MAC in concentrazione sublitica inducono l'espressione della sola P-selectina [31, 34], favorendo pertanto il rolling dei neutrofilii. Il MAC sublitico può indurre l'espressione della E-selectina e dell'ICAM-1 [35] solo se è presente contemporaneamente il Tumor Necrosis Factor (TNF) con il quale svolge un effetto sinergico. Le cellule endoteliali inoltre possono essere attivate dal MAC sublitico a produrre ed a secernere IL-8, MCP-1 [36] e il PAF [37].

Il C3 ed il TCC legano le EC come conseguenza dell'attivazione complementare modulata da anticorpi che fissano il C e che reagiscono con antigeni presenti sulla superficie delle EC. La presenza di questo tipo di anticorpi è stata osservata in pazienti che presentavano malattie autoimmuni associate a vasculiti o in seguito a rigetto iperacuto del trapianto. Più frequentemente il C si attiva nel plasma per la presenza di attivatori circolanti, come LPS, o in seguito all'esposizione della matrice sottoendoteliale causata da un danno fisico dell'endotelio o all'arretramento delle EC come risposta a citochine o ad altri mediatori infiammatori [38].

Anche il TCC nella sua forma citoliticamente non attiva, che si ritrova in circolo in seguito a condizioni cliniche associate ad una massiva attivazione complementare, come sepsi, SLE (lupus eritematoso sistemico) o durante la circolazione extracorporea, può legarsi alle membrane endoteliali. Studi condotti nel nostro laboratorio hanno infatti dimostrato che l'iTCC lega la superficie delle EC in modo dose-dipendente nonostante abbia perso la sua capacità citolitica [16], spingendoci a studiare gli effetti biologici dell'iTCC nella promozione della flogosi. L'iTCC è stato considerato per molto tempo un prodotto di attivazione del sistema complementare apparentemente senza

funzione specifica. Il punto di partenza per attribuire a questo complesso un ruolo ben definito è stato l'osservazione clinica che pazienti con deficienza ereditaria degli ultimi componenti complementari presentano una spiccata suscettibilità a meningite meningococcica ma, a differenza dei pazienti con complemento normale, presentano con minore frequenza shock settici, coagulazione intravasale e porpora [39, 40]. A questo, si sono aggiunte osservazioni "in vivo" che dimostravano in diverse patologie depositi di complesso terminale sulle pareti dei vasi in seguito a massiva attivazione complementare [41]. Nostri dati precedenti hanno permesso di documentare che l'iTCC è capace di indurre l'espressione di ELAM, di VCAM-1 e di ICAM-1 dimostrando che l'iTCC promuove il processo flogistico. Più recentemente studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che le cellule endoteliali rappresentano un bersaglio preferenziale, oltre che per il C5a [31] ed il C3bi [42], anche per l'iTCC e che queste interazioni promuovono la flogosi favorendo l'adesione, la migrazione e l'accumulo tissutale di neutrofili [43].

1.3.2 SINTESI DEI COMPONENTI COMPLEMENTARI DA PARTE DELLE EC

I componenti complementari ed i regolatori del sistema sono sintetizzati principalmente dagli epatociti. Tuttavia si è visto che anche cellule di altri organi e tessuti possono produrli [44]. Considerando che l'endotelio ricopre una vasta superficie del torrente circolatorio, numerosi sono stati gli studi che si sono occupati di esaminare la capacità delle EC di sintetizzare i componenti complementari [6]. Fino ad oggi è noto che le EC sintetizzano C3 [45], il fattore B [46] ed alcuni dei componenti terminali del C [47]. Recentemente studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che le EC isolate dalla vena del cordone ombelicale umano (HUVEC) sono in grado di produrre e secernere il C7 ed il C3. E' stato dimostrato che le citochine modulano la secrezione del C3 e del C7 in modo diverso, in particolare l'IFN- γ provoca

una drastica riduzione della secrezione del C7 e non altera quella del C3, mentre il TNF- α e l'IL-1 α inducono un aumento significativo del C3 ma non del C7 [48].

Un'osservazione particolarmente importante è quella che le EC sintetizzano più regolatori rispetto ai componenti complementari. I regolatori che sono prodotti dall'endotelio comprendono il C1-inibitor [49], i fattori H ed I [50, 51] e le proteine legate alla membrana CD46 (DAF), CD55 (MCP) e CD59 [52-54]. Il fatto che le EC sintetizzino predominantemente i regolatori del complemento rispetto agli altri componenti del sistema, può essere attribuito all'esigenza che hanno queste cellule di essere protette dal continuo attacco del C, che può derivare dai componenti attivati rilasciati nel plasma o nei fluidi extravascolari. Il C7 secreto dalle EC molto probabilmente gioca un ruolo protettivo controllando l'effetto citolitico del TCC formato vicino alla membrana e capace di causare un danno alla cellula [48]. E' noto infatti che, durante l'attivazione del sistema del C, il C5b6 si lega al C7 producendo una transitoria modificazione idrofilica-anfifilica che conferisce al complesso trimolecolare, appena formato, la capacità di legarsi allo strato fosfolipidico della membrana cellulare [55]. Il complesso trimolecolare formato perde molto rapidamente la capacità di legarsi alle membrane, ma mantiene quella di legare la proteina S e gli altri componenti terminali, portando alla formazione del TCC citolicamente inattivo che a seconda che presenti la proteina S o meno è chiamato SC5b-9 o iTCC [56]. Anche se il complesso terminale formato non è più capace di causare la lisi cellulare esso può ancora legarsi alle cellule stimolando la flogosi e la coagulazione [16, 43].

2 SCOPO DELLA RICERCA

La *prima parte* di questa tesi si sviluppa sull'ipotesi che il complesso terminale del C citoliticamente inattivo possa promuovere anche un'altro aspetto del processo infiammatorio: l'aumento della permeabilità vascolare. Numerose sono le evidenze portate dalla letteratura che il complesso terminale del complemento, in seguito all'attivazione massiva del sistema, promuove diverse fasi del processo flogistico. E' noto, infatti, che tale complesso molecolare, interagendo con l'endotelio, stimola l'attività procoagulante del fattore tissutale prodotto dalle EC stesse e, inoltre induce l'espressione delle molecole di adesione e la migrazione transendoteliale dei leucociti neutrofilici [16, 43]. Lo scopo del nostro lavoro è stato quindi quello di valutare il contributo dell'iTCC e della sua forma presente nel torrente circolatorio, l'SC5b-9, all'induzione della permeabilità vascolare nel corso della flogosi. Inizialmente, abbiamo voluto accertare se il complesso potesse promuovere l'aumento della permeabilità endoteliale, utilizzando un modello "in vitro". Abbiamo poi studiato il ruolo dell'endotelio in questo fenomeno andando a considerare quali potessero essere i fattori coinvolti nell'aumento della permeabilità, utilizzando particolari inibitori del PAF e del sistema delle chinine, che sono molecole particolarmente coinvolte nelle risposte endoteliali durante questa fase della flogosi. I dati ottenuti con il modello "in vitro" sono stati supportati anche da esperimenti condotti "in vivo" nel ratto. Infine abbiamo voluto esaminare l'effetto dell'SC5b-9 sull'integrità dell'endotelio utilizzando tecniche di microscopia elettronica a trasmissione su sezioni del microcircolo mesenterico "ex vivo".

Nella *seconda parte* della tesi abbiamo voluto prendere in esame la possibilità che il C7 fosse presente sulla membrana delle EC e potesse agire da accettore silente per i componenti complementari terminali attivati, garantendo alle EC una protezione contro un'eccessiva attivazione del sistema.

Il complesso terminale si forma nel torrente circolatorio, e si deposita in alcuni tessuti come il miocardio [57], il rene [58], la sinovia [59] o il sistema nervoso centrale [60], in condizioni patologiche. E' noto, infatti, che i componenti complementari, compresi quelli terminali, sono sintetizzati non solo dalle cellule epatiche, che rappresentano il più importante sito di produzione di questi componenti per il sangue circolante, ma anche da molte altre cellule presenti nei tessuti, come macrofagi, fibroblasti e cellule endoteliali [44]. Si è visto, inoltre, che le EC sintetizzano i regolatori del C in quantità maggiore rispetto agli altri componenti [49-52, 54]. Studi condotti nel nostro laboratorio avevano dimostrato che le HUVEC sono in grado di sintetizzare C3 e C7 [48].

Per valutare la presenza dei componenti C3 e C7 sulla membrana abbiamo applicato diverse tecniche comprendenti l'ELISA, la microscopia a fluorescenza e quella elettronica a trasmissione. Inoltre, dopo aver dimostrato la presenza sulla membrana cellulare del C7 ma non del C3, abbiamo studiato i possibili ruoli funzionali di tale molecola, accertando una sua eventuale attività di "decoy acceptor" per gli altri componenti complementari. In particolare, è stato valutato un possibile effetto protettivo svolto dal C7 di membrana sulle EC nei confronti del TCC solubile. Abbiamo studiato quindi come la formazione del complesso terminale sul C7 di membrana (mTCC) inibisca l'effetto proinfiammatorio svolto dal TCC solubile sulle EC, valutando l'espressione delle molecole di adesione, la produzione di IL-8 e l'aumento della permeabilità vascolare.

3 PARTE PRIMA

Platelet-Activating Factor and Kinin-Dependent Vascular Leakage as a Novel Functional Activity of the Soluble Terminal Complement Complex

Fleur Bossi,* Fabio Fischetti,† Valentina Pellis,* Roberta Bulla,* Elisabetta Ferrero,§ Tom Eirik Mollnes,‡ Domenico Regoli,[¶] and Francesco Tedesco*

The infrequent occurrence of septic shock in patients with inherited deficiencies of the terminal complement components experiencing meningococcal disease led us to suspect that the terminal complement complex is involved in vascular leakage. To this end, the permeabilizing effect of the cytolytically inactive soluble terminal complement complex (SC5b-9) was tested in a Transwell system measuring the amount of fluorescein-labeled BSA (FITC-BSA) leaked through a monolayer of endothelial cells. The complex caused increased permeability to FITC-BSA after 15 min as opposed to the prompt response to bradykinin (BK). The effect of SC5b-9 was partially reduced by HOE-140 or CV-3988, two selective antagonists of BK B2 and platelet-activating factor receptors, respectively, and was completely neutralized by the mixture of the two antagonists. Also, DX-88, a specific inhibitor of kallikrein, partially inhibited the activity of SC5b-9. The permeabilizing factor(s) released after 30 min of incubation of endothelial cells with SC5b-9 caused a prompt leakage of albumin like BK. Intravital microscopy confirmed both the extravasation of circulating FITC-BSA across mesenteric microvessels 15 min after topical application of SC5b-9 and the complete neutralization by the mixture of HOE-140 and CV-3988. SC5b-9 induced opening of interendothelial junctions in mesenteric endothelium documented by transmission electron microscopy. *The Journal of Immunology*, 2004, 173: 6921–6927.

The endothelium is a potential target of biologically active products of the complement system released in the circulation and in the extravascular fluids in several clinical conditions associated with marked C activation. One consequence of endothelial cell stimulation is the promotion of leukocyte traffic resulting in the initiation and progression of the inflammatory process, but additional biological effects induced by C activation on endothelial cells include triggering of coagulation and regulation of the vascular tone (1–3).

The membrane attack complex (MAC)³ formed by the late C components may be assembled on the surface of endothelial cells as a result of C activation by cell-bound Abs. Cytolysis of target cells has been considered for years the best known function of this complex following its insertion into the phospholipid bilayer of the cell membrane. Data accumulated during the last 10–15 years have

elucidated a number of noncytolytic effects induced by sublytic MAC on endothelial cells including mobilization of P-selectin (4), release of chemokines (5), growth factors (6), and platelet-activating factor (PAF) (7), and increased expression of E-selectin and ICAM-1 in cooperation with TNF- α (8). Stimulation of prothrombinase activity (9) and tissue factor expression (10) and promotion of PGI₂ release (11) leading to modulation of the vascular tone represent additional effects of sublytic MAC. Most of these activities are induced through the action of IL-1 α produced by endothelial cells stimulated by the C complex (2).

The terminal C complex (TCC) that assembles in the fluid phase and fails to insert into the cell membrane rapidly decays becoming cytolytically inactive. This complex known as SC5b-9, where S stands for S protein or vitronectin, is detected in the circulation and in the extravascular fluid and is commonly regarded as an irrelevant byproduct of C activation (12), although a possible effect of SC5b-9 was postulated by Ishikawa et al. (13) in pulmonary hydraulic conductivity. We have previously shown that a cytolytically inactive complex (iTCC), prepared by incubating purified late components and differing from SC5b-9 for the lack of vitronectin and clusterin, despite the inability to lyse target cells, was still able to bind to endothelial cells and to stimulate these cells to express adhesion molecules and tissue factor (14). In subsequent studies, evidence was also provided indicating that iTCC applied on the abluminal side of the endothelial cells promoted transendothelial migration of polymorphonuclear leukocytes (PMN) in a Transwell system and leukocyte traffic across rat mesenteric venules monitored in vivo by intravital microscopy (15). More recently, iTCC injected into the lateral ventricle of the CNS in rats was found to recruit intravascular PMN into the tissue and the cerebrospinal fluid and SC5b-9 purified from human serum proved to be as effective as iTCC (16). SC5b-9 is the inactive complex detected in measurable amounts in patients with septic shock (17, 18), immune complex diseases (19),

Departments of *Physiology and Pathology and †Medicine and Neurology, University of Trieste, Trieste, Italy; ‡Institute of Immunology, Rikshospitalet University Hospital, Oslo, Norway; §IRCCS H. San Raffaele, Milan, Italy; and ¶Pharmacology Section, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Ferrara, Ferrara, Italy

Received for publication June 22, 2004. Accepted for publication September 1, 2004.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants provided by the Italian Ministero dell' Istruzione, dell' Università e della Ricerca (Cofin 2003-06220_004 and Fondo per gli Investimenti della Ricerca di Base 2001-RBAU01C3CJ), Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro grant 2003-1964 and EU-concerted action (contract QLG1-CT-2001-01039) (to F.T.), and a 60% grant from Ferrara University (to D.R.).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. F. Tedesco, Dipartimento di Fisiologia e Patologia, Università di Trieste, Via Fleming 22, 34127 Trieste, Italy. E-mail address: tedesco@univ.trieste.it

³ Abbreviations used in this paper: MAC, membrane attack complex; SC5b-9, soluble terminal complement complex; iTCC, cytolytically inactive terminal complement complex; BK, bradykinin; PAF, platelet-activating factor; PMN, polymorphonuclear leukocytes; TCC, terminal C complex; iTCC, cytolytically inactive TCC; FI, fluorescent intensity; vFI, venule FI; iFI, interstitial FI.

severe traumata (20), cardiopulmonary bypass, and other therapeutic procedure including extracorporeal circulation of blood (21).

The finding that iTCC interacts with endothelial cells, stimulating the expression of adhesion molecules and transendothelial migration, led us to investigate the ability of this complex to induce increased permeability of the endothelium. This function is usually associated with C3a and C5a, but the clinical observation that meningococcal disease occurring in patients with inherited deficiencies of the late C components is less frequently complicated by purpura, hypotension, and septic shock (22, 23) than in patients with normal C activity suggests that TCC may also be implicated in the induction of the vascular leakage. Because these clinical complications are associated with structural and functional changes of the endothelium resulting in increased permeability and tissue edema (24), it is conceivable that C-deficient patients are protected from vascular leakage because of their failure to form TCC. In addition, the trimolecular complex C5b-7 inserted into cell membrane as a result of Ab-dependent C activation was shown by Saadi and Platt (25) to induce transient gap formation.

On the basis of these findings, we decided to investigate whether the inactive TCC was able to increase vascular permeability using *in vitro* and *in vivo* models. Data are presented indicating that iTCC and SC5b-9 are both effective in inducing vascular leakage and that this effect is mediated by bradykinin (BK) and PAF.

Materials and Methods

C components, antisera, and other reagents

Purified late C components C7, C8, and C9 were purchased from Quidel (San Diego, CA). The mAb aE11 recognizing a C9 neopeptide, and rabbit polyclonal Abs to C9 and to vitronectin were reported in previous publications (14, 26, 27). Goat antiserum to human C5 was purchased from Quidel; alkaline phosphatase-labeled affinity-purified Abs from goat to mouse IgG were obtained from Sigma-Aldrich (Milan, Italy). The IgG were purified from the antisera by affinity chromatography on a protein G-Sepharose column (Pharmacia Biotech, Milan, Italy). FITC-conjugated BSA was purchased from Sigma-Aldrich, and the PAF receptor antagonist CV-3988 was from Biomol (Plymouth Meeting, PA). BK and BK B2 receptor antagonist HOE-140 were kindly provided by Dr. W. Neugebauer (Sherbrooke University, Quebec, Canada), and DX-88 was obtained through the courtesy of Dr. Tony Williams (Dyax, Cambridge, MA).

Preparation of TCC

C5b6 and iTCC were prepared as previously reported (14). Briefly, the C5b6 complex was purified from yeast-activated C7-depleted serum, and iTCC was obtained by mixing C5b6 and the remaining late C components C7, C8, and C9 at optimal ratio. SC5b-9 was prepared as published in detail by Casarsa et al. (16) incubating C5b6 complex and C5-deficient human serum as a source of the late C component and the fluid phase C regulators vitronectin and clusterin. The mixture of C5b6 and C7-deficient human serum, which was unable to support assembly of SC5b-9, served as a negative control. All the assembled C complexes were then purified by fast protein liquid chromatography on a Superose 12 column (Pharmacia Biotech, Milan, Italy) and quantitated by ELISA using mAb aE11 reacting with a neopeptide exposed on activated C9 as capture Ab and goat IgG anti-human C5 as detecting Ab (14).

Endothelial cell leakage

HUVECs were isolated from three to five normal umbilical cords by collagenase digestion and grown in tissue culture plates (Costar, Cambridge, MA) coated with 2% endotoxin-free gelatin (14). The cells (2×10^4) were seeded onto polycarbonate inserts of a 24-well Transwell system (6.5-mm diameter, 3- μ m-diameter pores; Costar) coated with 2% gelatin and used 5 days after plating (15). Each Transwell was checked for the formation of intact monolayer on the insert by adding FITC-BSA (1 mg/ml) to the upper chamber and measuring the amount of labeled BSA passed into the lower chamber by a Fluostar (SLT Labinstruments, Grödig, Austria). The Transwells were used only when the intensity of fluorescence in the lower chamber was negligible; in this case, the stimuli were added to the upper chamber together with FITC-BSA, and the fluorescence was evaluated in the lower chamber at various time intervals.

Assessment of vascular permeability by intravital microscopy

All the *in vivo* experiments were performed on male Wistar Kyoto rats weighing 250–270 g and anesthetized *i.p.* with sodium thiobarbital (100 mg/kg). A procedure previously described in detail was followed for the surgical preparation of rats (15). FITC-BSA diluted in sterile saline was slowly infused into the femoral vein at a concentration of 15 mg/kg 30 min before the start of the experiment. After the incision of the abdominal wall, a portion of the ileal mesentery was gently draped over a Plexiglas transparent pedestal placed on an adjustable stage of an upright microscope (model BX50WI; Olympus Optical, Tokyo, Japan). Two hundred microliters of sterile saline containing 4 μ g of either SC5-9 or BK to the final concentration of 10^{-7} was topically applied to the exposed mesentery for 5 min followed by superfusion (1 ml/min flow rate) with sterile buffered saline at 37°C throughout the experiment. The microvascular areas were transilluminated with a 12-V, 100-W direct current-stabilized light source and viewed through a $\times 10$ saltwater dipping objective (Olympus Optical) fitted for epifluorescence. The images of the distribution of FITC-BSA were recorded by a charge-coupled device camera (SensiCam PCO, Kelheim, Germany) connected through a PCI-interface board to a computer device, and analyzed off-line using a dedicated imaging software (Analytica Lite, Milan, Italy). The leakage of FITC-BSA across mesenteric venules was analyzed in 20- \times 50- μ m windows positioned within the venule (vFI) and in the perivenular interstitium (iFI), 50 μ m away from the vessel wall. At least two fields of observations, each including distinct unbranched postcapillary venules (35–40 μ m in diameter and 100 μ m long), were selected for the analysis. The fluorescent intensity (FI) of extravasated FITC-BSA was assessed automatically using the imaging software analysis and calculated as mean value of gray levels ranging between 0 (black) and 255 (white). The albumin leakage index was expressed as the ratio iFI:vFI.

Transmission electron microscopy

Biopsy specimens obtained from the ileal mesentery after perfusion with different stimuli were washed twice with PBS and once with 0.1 M cacodylate buffer and then minced in 1-mm² pieces. After fixation with 3% glutaraldehyde for 3 h at room temperature, the pieces were washed and treated with OsO₄ for 1 h. After two washings with 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4), they were serially dehydrated in ethanol, infiltrated with propylene oxide, and embedded in DERR 332 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Tissue sections were cut with an ultramicrotome (Leica Ultracut UCT, Vienna, Austria) and collected on 200-mesh copper grid. The grids were stained with uranyl acetate and lead citrate and viewed under a Philips EM 208 transmission electron microscope (Philips, Eindhoven, The Netherlands).

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SD. Data were compared by ANOVA using post hoc analysis for paired multiple comparisons with Fisher's corrected *t* test. *p* values of <0.05 were considered statistically significant.

Results

Terminal complement complexes induce endothelial permeabilization

In the first series of experiments, we tested the ability of iTCC and SC5b-9 to cause leakage of FITC-BSA through a confluent monolayer of HUVECs using a concentration of the complexes (5 μ g/ml) that in our previous study proved to be effective in promoting transendothelial migration of PMN (15). The effect of these two cytolytically inactive complexes were compared with that of the known permeabilizing polypeptide BK, used as a positive control, and was evaluated at various time intervals after their addition to HUVECs (Fig. 1A). As expected, BK produced a rapid effect that began to appear after 5 min and increased thereafter up to 30 min. The percentage of FITC-BSA that leaked into the lower chamber of the Transwell at 30 min was calculated to be \sim 5%. By contrast, iTCC was ineffective for the first 15 min and reached the maximal permeabilizing effect at 30 min resulting in \sim 4.8% leakage of FITC-BSA. The results obtained with SC5b-9 were essentially similar to those seen with iTCC. Because the degree of permeability to BSA remained unchanged from 30 min to up to 90 min of observation (data not shown), we decided to stop the analysis of the leakage 30 min after the addition of the reagents. We also

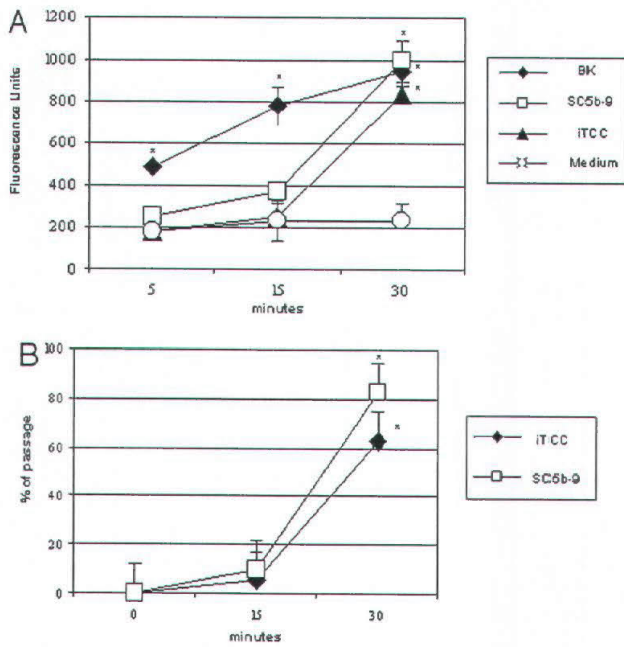


FIGURE 1. Kinetic analysis of BSA and TCC leakage through HUVECs. The cells were grown to confluence onto the inserts of Transwells and exposed to BK (10^{-6} M), iTCC ($5 \mu\text{g/ml}$), or SC5b-9 ($5 \mu\text{g/ml}$) added to the upper chamber. The passage of BSA (A) into the lower chamber at various time intervals was evaluated by Fluostar and that of iTCC or SC5b-9 (B) was measured by ELISA. Values are means \pm SD of duplicate determinations of four separate experiments. *, $p < 0.01$ vs medium.

measured the amounts of the two C complexes that had passed through the HUVEC monolayer at various time intervals and found detectable levels of these complexes in the lower chamber of the Transwell only after 30 min (Fig. 1B).

To evaluate the dose-dependent effect of the complexes, increasing concentrations of both iTCC and SC5b-9 were tested for their permeabilizing activity. As shown in Fig. 2, iTCC began to induce the effect at $2.5 \mu\text{g/ml}$, reaching the plateau at $5 \mu\text{g/ml}$ with no

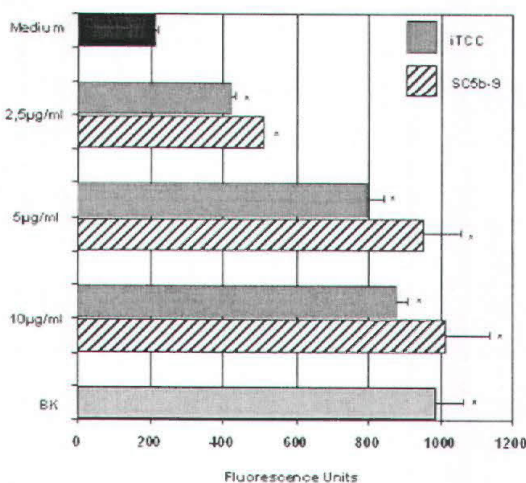


FIGURE 2. Effect of increasing doses of iTCC or SC5b-9 on the permeability of HUVEC. The cells grown to confluence onto the insert of the Transwell were incubated for 30 min with increasing concentrations of either iTCC or SC5b-9 and with BK (10^{-6} M), as a positive control, and the FITC-BSA passed through the monolayer was measured using Fluostar. Values are means \pm SD of duplicate determinations of 3 different experiments. *, $p < 0.01$ vs medium.

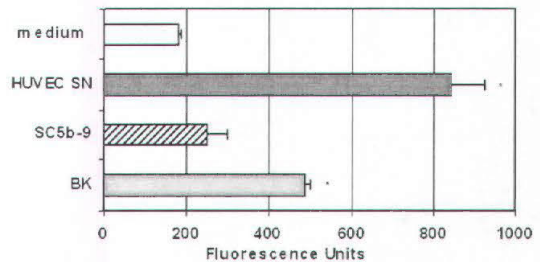


FIGURE 3. Contribution of HUVEC to the release of the permeabilizing factors induced by the C complex. The HUVEC monolayer was incubated with SC5b-9 ($5 \mu\text{g/ml}$) for 30 min, and the supernatant (SN) was collected and incubated with fresh HUVEC for 5 min. SC5b-9 ($5 \mu\text{g/ml}$), or BK (10^{-6} M) were tested separately on HUVEC for the same length of time. The amount of FITC-BSA passed through the monolayer of HUVEC into the lower chamber was evaluated by Fluostar. Values are mean fluorescence $U \pm$ SD of duplicate determinations of three different experiments. *, $p < 0.01$ vs medium.

further increase at $10 \mu\text{g/ml}$. SC5b-9 was as active as iTCC at the same concentrations. The concentration range of the active complex is compatible with the levels of SC5-9 found in many pathological conditions (18, 28, 29). On the basis of these results and given the fact that SC5b-9 is usually detected in the circulation and in the extravascular fluids, we decided to use only this complex in all the other experiments at the concentration of $5 \mu\text{g/ml}$. The effect obtained with this amount of iTCC or SC5b-9 roughly corresponds to that obtained with BK used at a concentration of 10^{-6} M. The activity of iTCC was inhibited by two different anti-C9 Abs, whereas the effect of SC5b-9 was neutralized both by anti-C9 and anti-vitronectin Abs (data not shown).

The permeability of HUVECs induced by SC5b-9 is mediated through the action of kinins and PAF

Because the permeabilizing effect of SC5-9 was delayed compared with the prompt response obtained with BK, the possibility was considered that the C complex acts by inducing the release of intermediate mediators. To address this issue, HUVECs were exposed to SC5b-9 for 30 min, the time at which the complex exhibited the maximal permeabilizing effect, and the supernatant was

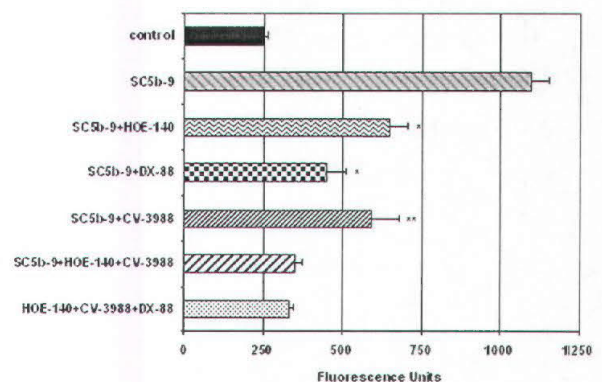


FIGURE 4. Effect of the kallikrein inhibitor DX-88, B2-BK (HOE-140), and PAF (CV-3988) receptor antagonists on SC5b-9-dependent endothelial cell leakage. DX-88 (0.1 mg/ml), HOE-140 (10^{-5} M), CV-3988 (3×10^{-5} M), or the mixture of the molecules were added to the HUVEC monolayer 10 min before incubation with SC5b-9 ($5 \mu\text{g/ml}$). Thirty minutes after the addition of SC5b-9, FITC-BSA added to the upper chamber was collected into the lower chamber and measured by Fluostar. Values are means \pm SD of duplicate determinations of three different experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs SC5b-9.

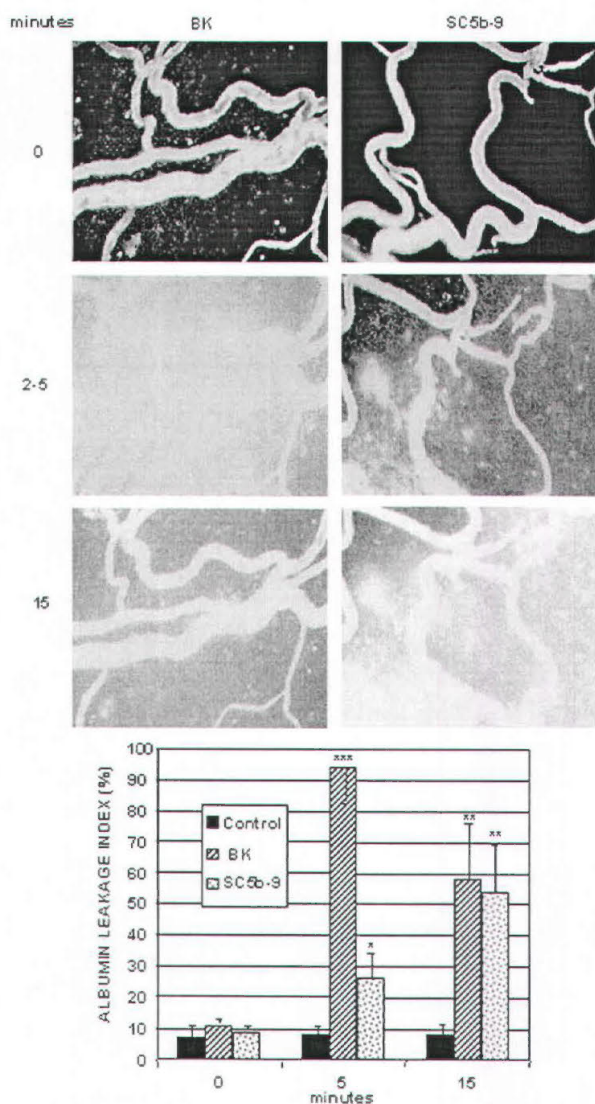


FIGURE 5. In vivo effect of SC5b-9 on the vascular leakage. The ileal mesentery was superfused with BK (10^{-7} M) or SC5b-9 ($4 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$), and the amount of FITC-BSA extravasated into the perivascular areas was monitored under basal conditions and 2–5 and 15 min after the topical application of the stimuli. Values are means \pm SD of the observations made in three animals as specified in *Materials and Methods*. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$ vs control.

tested for its ability to induce leakage of BSA on untreated HUVEC after incubation for 5 min. As shown in Fig. 3, the cell supernatant caused a prompt transendothelial passage of an amount of BSA that was higher than that induced by BK, whereas SC5b-9 had only a marginal effect, which was in line with the data presented in Fig. 1A. Formation of vasoactive factor(s) with this rapid effect required the presence of HUVECs because no such activity was found in the culture medium incubated with SC5b-9 for 30 min in the absence of HUVECs. On the basis of these results, we reckoned that BK released as a result of HUVEC stimulation by SC5b-9 was a likely candidate to mediate this effect. To this end, HUVECs were treated with HOE-140, a specific BK B2 receptor antagonist, 10 min before addition of BK or SC5b-9. The results presented in Fig. 4 show that the transendothelial passage of BSA was reduced but not completely abolished by the presence of this antagonist, and a partial inhibitory effect was also obtained by the addition of DX-88, a recombinant inhibitor of plasma kal-

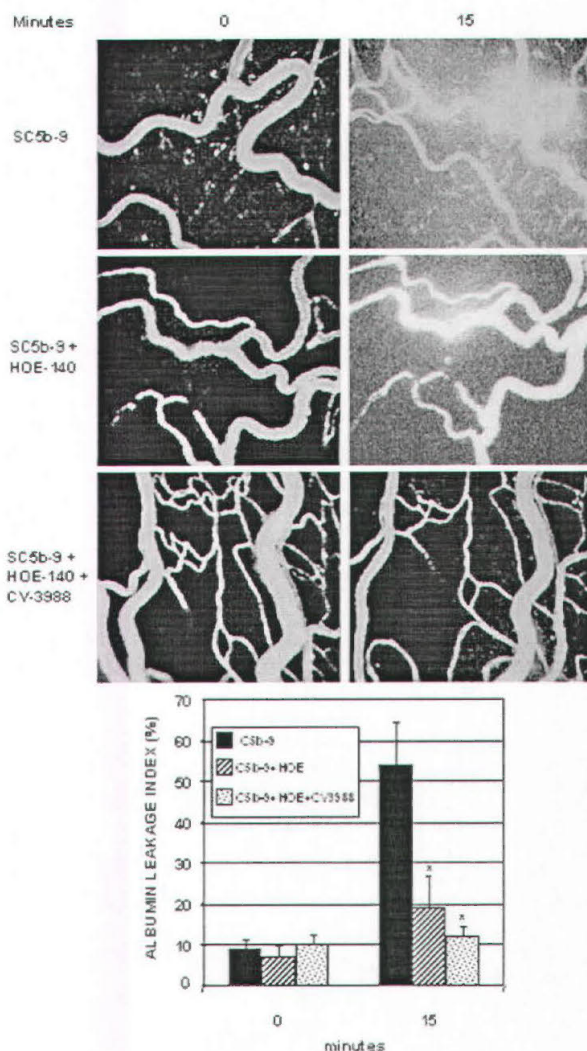


FIGURE 6. Effect of HOE-140 and CV3988 on SC5b-9-induced vascular leakage. The ileal mesentery was superfused with SC5b-9 alone ($4 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$) or with SC5b-9 mixed with either HOE-140 (10^{-6} M) or the combination of HOE-140 and CV-3988 (3×10^{-5} M), and the leakage of FITC-BSA was assessed under basal conditions and 15 min after the topical application of the reagents. Data are means \pm SD of the observations made in three animals as specified in *Materials and Methods*. *, $p < 0.01$ vs SC5b-9.

likrein. Because the effect of SC5b-9 was only partially blocked by HOE-140, we investigated the possibility that PAF may contribute to the increase in the permeability of HUVEC induced by SC5b-9 using CV-3988, a specific PAF receptor antagonist. As already seen with HOE-140, CV-3988 incubated with HUVEC for 10 min before the addition of the complex again reduced but did not completely prevent the leakage of BSA, whereas the mixture of the two antagonists HOE-140 and CV-3988 completely inhibited the transendothelial passage of BSA (Fig. 4).

In vivo effect of SC5b-9 on vascular permeability

Having found that SC5b-9 induced increased permeability of HUVECs to BSA, we next examined the ability of the C complex to promote in vivo vascular leakage to BSA across mesenteric venules. As expected, BK caused a prompt extravasation of FITC-BSA that was already visible 5 min after exposure of the ileal mesentery to this peptide, confirming the results obtained in vitro (Fig. 5). The

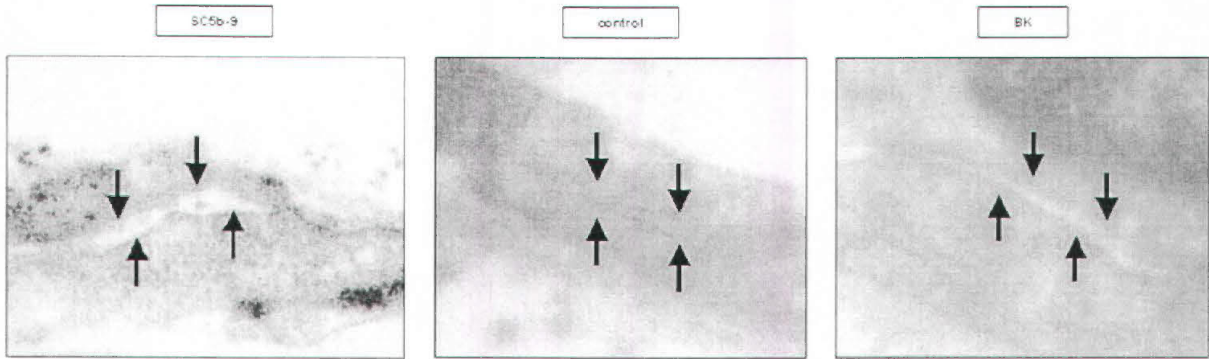


FIGURE 7. Transmission electron microscopic analysis of rat mesenteric microvasculature exposed to SC5b-9 or BK. Biopsy specimens of rat mesenteric ileum superfused with the different stimuli were cut and minced in fixing buffer and processed as described in *Materials and Methods*. $\times 36,000$.

increased vascular permeability induced by BK reached an albumin leakage index value of $>90\%$ after 5 min and declined to $\sim 58\%$ after 15 min. A significant increase in BSA leakage was also induced by SC5b-9, although the kinetic was different from that observed with BK (Fig. 5). The mean value of albumin leakage index was $\sim 25\%$ 5 min after the addition of SC5b-9 and progressively increased to $\sim 50\%$ at 15 min. The vascular permeability in response to SC5b-9 was markedly controlled by previous exposure of the ileal mesentery to HOE-140 and completely inhibited by the mixture of HOE-140 and CV-3988 (Fig. 6).

SC5b-9 induces opening of intercellular junctions

Because the increased permeability stimulated by some vasoactive substances has been associated with the formation of interendothelial gaps (30, 31), we decided to investigate the possible association between the loss of the endothelial barrier function, as revealed by the extravasation of albumin, and the appearance of morphological changes of the endothelial cells. To address this issue, the mesentery was superfused with SC5b-9, BK, or saline solution. The animals were sacrificed at 30 min, and a mesenteric biopsy specimen was cut and prepared for transmission electron microscopy analysis. As expected, BK caused ultrastructural changes in the endothelium of rat mesenteric microvasculature characterized by the appearance of openings of intercellular junctions already visible 5 min after treatment with this peptide together with the extravasation of FITC-BSA (Fig. 7). SC5b-9 induced similar morphological changes, although the openings were visible only 30 min after the addition of the complex.

Discussion

C activation in the circulation leads to the release of biologically active products that induce several functional changes of the endothelium including promotion of inflammation and coagulation. Vascular leakage is one such change that results in tissue edema and is commonly associated with the action of C3a and C5a (2, 32). The *in vitro* and *in vivo* data presented in this study clearly indicate that the inactive terminal complex is also able to cause vascular permeability.

The finding that iTCC has a direct effect on the permeability of HUVEC monolayer in a Transwell system extends our previous observations that the complex stimulates the expression of adhesion molecules and tissue factor and promotes transendothelial migration of leukocytes, despite its inability to cause cell lysis (14, 15). The permeabilizing effect is not restricted to iTCC but is also seen with SC5-9, a complex detected in the circulation in clinical conditions associated with massive C activation and commonly regarded as an irrelevant byproduct of C activation. However, the

report by Brandtzaeg et al. (18) that the level of SC5b-9 is strongly correlated to the levels of endotoxin and to fatality in patients with meningococcal disease might suggest that the complex is implicated in the development of the disease complications including septic shock. We have previously shown that this complex injected into the lateral ventricle of rats promoted inflammation mobilizing leukocytes into the CSF (16). The ability of Abs to C9 to control the albumin leakage induced by both iTCC and SC5b-9 supports the conclusion that the effect of these complexes is specific. In the case of SC5b-9, the neutralizing activity of the Abs to vitronectin suggests that the effect of this complex may also be mediated by its binding to the vitronectin receptor on endothelial cells. The biological relevance of the interaction between SC5b-9 and the vitronectin receptor was emphasized a few years ago by Biesecker (33), who showed that myoblasts adhered to solid phase-bound SC5b-9, implicating the potential role of this complex in cell attachment and cellular response at tissue level. Whether binding of iTCC to HUVEC is receptor mediated cannot be established. Our preliminary data suggest the existence of such a receptor; however, the data are not conclusive and must be further substantiated.

The detection of iTCC and SC5b-9 in the lower chamber of the Transwell following stimulation of HUVECs with the two complexes clearly indicates that the increased permeability of these cells is not selective for BSA. As a result of the increased permeability of the endothelium, these complexes may diffuse out into the subendothelial areas and stimulate perivascular macrophages and other cells to release proinflammatory mediators. The leakage of SC5b-9 through the monolayer of endothelial cells is compatible with the appearance of wide focal dilations in intercellular junctions of HUVECs seen on electron microscopy sections of rat mesenteric vessels of rats exposed *in vivo* to SC5b-9. C-dependent intercellular gaps were already observed by Saadi and Platt (25) in monolayers of porcine endothelial cells incubated with human xenoreactive natural Abs and human serum as a source of C. However, the formation of gaps in this model was strictly dependent on the insertion of the trimolecular complex C5b-7 into the membrane, and the gaps tended to close when the C5b-9 complex was fully assembled on the cells. Conversely, the loss of barrier function that occurs under our experimental conditions does not require Ab-mediated C activation and is caused by the fully assembled and cytolytically inactive terminal complexes.

The leakage of FITC-BSA through the endothelium of rat mesenteric veins exposed to SC5b-9 proves that the loss of barrier function is not restricted to the *in vitro* model but can also be induced *in vivo*, thus extending our previous observation that

iTCC stimulates egression of leukocyte across rat mesenteric post-capillary venules into the perivascular tissue (15). A point to emphasize is that the extravasation of BSA is stimulated by SC5b-9 added at the extravascular sites in the mesenteric ileum, suggesting that the complex is equally effective in promoting vascular permeability on both sides of the vessels. We cannot exclude that the complex induces increased permeability through the intermediate action of mediators released by mast cells or macrophages present in the ileal mesentery and shown to be involved in the promotion of acute peritoneal inflammation (34).

One of the mediators involved in the SC5b-9-induced vascular leakage is likely to be BK, a potent vasodilator (35) with a strong and rapid activity on vascular permeability (36) as indicated by the inhibitory effect of HOE-140, a specific and selective antagonist of the kinin B2 receptor (37, 38), and the neutralizing activity of DX-88, an inhibitor of plasma kallikrein. Evidence that SC5-9 incubated with endothelial cells promotes the release and accumulation of BK-like material in the medium is also supported by the observation that the culture medium collected after a 30-min incubation of HUVECs with SC5b-9 induces a prompt BSA leakage very similar to that of BK. These findings indicate that SC5-9 interacts with endothelial cells and promotes the formation of BK possibly from a complex kininogen-prekallikrein present on the surface of the endothelium (39, 40). A similar mechanism has been proposed by Katada and Majima (41) to explain the release of BK and the arterial vasodilatation observed in isolated and perfused mesenteric artery following the interaction of angiotensin II with its type 2 receptor. The functional relationship that cell bound SC5b-9 establishes with the putative receptors for high molecular mass kininogen on endothelial cells including gC1qR, cytokeratin 1 and u-PAR (42) remains to be elucidated.

The other endogenous agent participating to the BSA leakage induced by SC5b-9 is PAF. In fact, the other half of the effect, which remains in the presence of HOE-140, is blocked by CV-3988, a selective antagonist of the PAF receptor. BK and PAF are the two major mediators because a complete block of the effect of SC5-9 is observed with the combination of HOE-140 and CV-3988. The contribution of PAF to the endothelial cell leakage is not surprising because Kilgore et al. (7) have shown that sublytic MAC assembled on endothelial cells stimulates the release of PAF and in turn promotes neutrophil adhesion, although the complex used in the present study differs from MAC for being cytolytically inactive.

Our finding that PAF activity is detected in the supernatant of HUVEC incubated with SC5b-9 for 30 min may be difficult to reconcile with the short half-life of PAF. This is certainly true if BK and PAF were rapidly released by HUVEC following the addition of SC5b-9 to the culture medium. However, the release of these peptides is unlikely to occur so rapidly because we have previously shown that the binding of iTCC to HUVEC requires >15 min to complete (14). Furthermore, the data presented in Fig. 1 show that the SC5b-9-mediated HUVEC permeability is a slow process and begins to appear after 20 min of cell incubation with the complex. This suggests that PAF and BK are released by HUVEC in the last 5-10 min of incubation with SC5b-9.

In conclusion, we have provided evidence that iTCC and its physiological counterpart SC5b-9 promotes the permeability of HUVECs through the release of BK and PAF, besides stimulating transendothelial migration of leukocytes. SC5b-9 should therefore be considered as a possible therapeutic target together with other vasoactive products of the C cascade in clinical situations, such as septic shock, associated with marked C activation. Furthermore, antagonists for PAF and the BK B2 receptors are likely to find promising applications in these conditions.

Acknowledgments

We thank Paolo Durigutto and Claudio Gamboz for excellent technical assistance.

References

- Tedesco, F., F. Fischetti, M. Pausa, A. Dobrina, R. B. Sim, and M. R. Daha. 1999. Complement-endothelial cell interactions: pathophysiological implications. *Mol. Immunol.* 36:261.
- Saadi, S., and J. L. Platt. 1998. Endothelial cell response to complement activation. In *The Human Complement System in Health and Disease*. J. Volanakis and M. Frank, eds. Marcel Dekker, New York, p. 335.
- Acosta, J., X. Qin, and J. Halperin. 2004. Complement and complement regulatory proteins as potential molecular targets for vascular diseases. *Curr. Pharm. Des.* 10:203.
- Hattori, R., K. K. Hamilton, R. P. McEver, and P. J. Sims. 1989. Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 264:9053.
- Kilgore, K. S., C. M. Flory, B. F. Miller, V. M. Evans, and J. S. Warren. 1996. The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 149:953.
- Benzaquen, L. R., A. Nicholson-Weller, and J. A. Halperin. 1994. Terminal complement proteins C5b-9 release basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor from endothelial cells. *J. Exp. Med.* 179:985.
- Kilgore, K. S., J. P. Shen, B. F. Miller, P. A. Ward, and J. S. Warren. 1998. Neutrophil adhesion to human endothelial cells is induced by the membrane attack complex: the roles of P-selectin and platelet activating factor. *Inflammation.* 22:583.
- Kilgore, K. S., J. P. Shen, B. F. Miller, P. A. Ward, and J. S. Warren. 1995. Enhancement by the complement membrane attack complex of tumor necrosis factor- α -induced endothelial cell expression of E-selectin and ICAM-1. *J. Immunol.* 155:1434.
- Hamilton, K. K., R. Hattori, C. T. Esmon, and P. J. Sims. 1990. Complement proteins C5b-9 induce vesiculation of the endothelial plasma membrane and expose catalytic surface for assembly of the prothrombinase enzyme complex. *J. Biol. Chem.* 265:3809.
- Saadi, S., R. A. Holzknecht, C. P. Patte, D. M. Stern, and J. L. Platt. 1995. Complement-mediated regulation of tissue factor activity in endothelium. *J. Exp. Med.* 182:1807.
- Suttorp, N., W. Seeger, S. Zinsky, and S. Bhakdi. 1987. Complement complex C5b-8 induces PGI₂ formation in cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 253:C13.
- Mollnes, T. E., T. Lea, and M. Harboe. 1984. Detection and quantification of the terminal C5b-9 complex of human complement by a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Scand. J. Immunol.* 20:157.
- Ishikawa, S., H. Tsukada, and J. Bhattacharya. 1993. Soluble complex of complement increases hydraulic conductivity in single microvessels of rat lung. *J. Clin. Invest.* 91:103.
- Tedesco, F., M. Pausa, E. Nardon, M. Introna, A. Mantovani, and A. Dobrina. 1997. The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J. Exp. Med.* 185:1619.
- Dobrina, A., M. Pausa, F. Fischetti, R. Bulla, E. Vecile, E. Ferrero, A. Mantovani, and F. Tedesco. 2002. Cytolytically inactive terminal complement complex causes transendothelial migration of polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo. *Blood* 99:185.
- Casarsa, C., A. De Luigi, M. Pausa, M. G. De Simoni, and F. Tedesco. 2003. Intracerebroventricular injection of the terminal complement complex causes inflammatory reaction in the rat brain. *Eur. J. Immunol.* 33:1260.
- Mollnes, T. E., H. Redl, K. Hogasen, A. Bengtsson, P. Garred, L. Speilberg, T. Lea, M. Oppermann, O. Gotze, and G. Schlag. 1993. Complement activation in septic baboons detected by neopeptide-specific assays for C3b/iC3b/C3c, C5a and the terminal C5b-9 complement complex (TCC). *Clin. Exp. Immunol.* 91:295.
- Brandtzaeg, P., T. E. Mollnes, and P. Kierulf. 1989. Complement activation and endotoxin levels in systemic meningococcal disease. *J. Infect. Dis.* 160:58.
- Chiu, Y. Y., R. M. Nishihara, R. Wurzner, M. Kirschfink, and I. J. de Messias-Reason. 1998. SC5b-9 is the most sensitive marker in assessing disease activity in Brazilian SLE patients. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 8:239.
- Fosse, E., J. Pillgram-Larsen, J. L. Svennevig, C. Nordby, A. Skulberg, T. E. Mollnes, and M. Abdelnoor. 1998. Complement activation in injured patients occurs immediately and is dependent on the severity of the trauma. *Injury.* 29:509.
- Clark, D. J., M. W. Cleman, S. E. Pfau, S. A. Rollins, T. M. Ramahi, C. Mayer, T. Cautin-Glaser, E. Daher, M. Kosiborod, L. Bell, and J. F. Setaro. 2001. Serum complement activation in congestive heart failure. *Am. Heart J.* 141:684.
- Tedesco, F., W. Nummerger, and S. Perissutti. 1993. Inherited deficiencies of the terminal complement components. *Int. Rev. Immunol.* 10:51.
- Platonov, A. E., V. B. Beloborodov, and I. V. Vershinina. 1993. Meningococcal disease in patients with late complement component deficiency: studies in the U.S.S.R. *Medicine (Baltimore)*. 72:374.
- Aird, W. C. 2003. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 101:3765.
- Saadi, S., and J. L. Platt. 1995. Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement. *J. Exp. Med.* 181:21.

26. Mollnes, T. E., T. Lea, S. S. Froland, and M. Harboe. 1985. Quantification of the terminal complement complex in human plasma by an enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies against a neoantigen of the complex. *Scand. J. Immunol.* 22:197.
27. Hogasen, K., T. E. Mollnes, and M. Harboe. 1992. Heparin-binding properties of vitronectin are linked to complex formation as illustrated by in vitro polymerization and binding to the terminal complement complex. *J. Biol. Chem.* 267:23076.
28. Ronholm, E., H. Tomasdottir, J. Runeborg, I. Mattsby-Baltzer, M. Olausson, A. Aneman, and A. Bengtsson. 2000. Gastro-intestinal complement activation during human liver transplantation: impact on postoperative liver function. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 44:850.
29. Messias-Reason, I. J., S. Y. Hayashi, R. M. Nisihara, and M. Kirschfink. 2002. Complement activation in infective endocarditis: correlation with extracardiac manifestations and prognosis. *Clin. Exp. Immunol.* 127:310.
30. Meyrick, B., and K. L. Brigham. 1984. Increased permeability associated with dilatation of endothelial cell junctions caused by histamine in intimal explants from bovine pulmonary artery. *Exp. Lung Res.* 6:11.
31. Baluk, P., A. Hirata, G. Thurston, T. Fujiwara, C. R. Neal, C. C. Michel, and D. M. McDonald. 1997. Endothelial gaps: time course of formation and closure in inflamed venules of rats. *Am. J. Physiol.* 272:L155.
32. Ember, J., M. Jagels, and T. Hugli. 1998. Characterization of complement anaphylotoxins and their biological responses. In *The Human Complement System in Health and Disease*. J. Volanakis and M. Frank, eds. Marcel Dekker, New York, p. 241.
33. Biesecker, G. 1990. The complement SC5b-9 complex mediates cell adhesion through a vitronectin receptor. *J. Immunol.* 145:209.
34. Ajuebor, M. N., A. M. Das, L. Virag, R. J. Flower, C. Szabo, and M. Perretti. 1999. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10. *J. Immunol.* 162:1685.
35. Regoli, D., and J. Barabe. 1980. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32:1.
36. Gabbiani, G., M. C. Badonnel, and G. Majno. 1970. Intra-arterial injections of histamine, serotonin, or bradykinin: a topographic study of vascular leakage. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 135:447.
37. Hock, F. J., K. Wirth, U. Albus, W. Linz, H. J. Gerhards, G. Wiemer, S. Henke, G. Breipohl, W. Konig, J. Knolle, et al. 1991. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br. J. Pharmacol.* 102:769.
38. Regoli, D., S. Nsa Allogho, A. Rizzi, and F. J. Gobeil. 1998. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 348:1.
39. Wolf, W. C., R. A. Harley, D. Sluce, L. Chao, and J. Chao. 1999. Localization and expression of tissue kallikrein and kallistatin in human blood vessels. *J. Histochem Cytochem.* 47:221.
40. Schmaier, A. H. 2004. The physiologic basis of assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system. *Thromb. Haemost.* 91:1.
41. Katada, J., and M. Majima. 2002. AT(2) receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *Br. J. Pharmacol.* 136:484.
42. Joseph, K., B. G. Tholanikunnel, B. Ghebrehwet, and A. P. Kaplan. 2004. Interaction of high molecular weight kininogen binding proteins on endothelial cells. *Thromb. Haemost.* 91:61.

4 PARTE SECONDA

4.1 PREMESSA

I componenti complementari vengono sintetizzati principalmente dalle cellule epatiche e rilasciati nel torrente circolatorio come molecole solubili. Tuttavia, anche cellule presenti in altri tessuti, come macrofagi, fibroblasti e cellule endoteliali, sono in grado di produrre tali molecole. Dati ottenuti nel nostro laboratorio [48], hanno dimostrato che le HUVEC sintetizzano C3 e C7, che vengono rilasciati nel sovrnatante. Il C7 prodotto dalle HUVEC ha un peso molecolare identico a quello del C7 presente nel siero, e mantiene la capacità di legarsi agli altri componenti terminali portando alla formazione del TCC.

La sintesi del C7 e del C3 da parte delle HUVEC può essere regolata in modo diverso da citochine proinfiammatorie. Per esempio, il TNF- α stimola la secrezione del C3, ma non influenza quella del C7, l'IL-1 α induce un aumento maggiore del C3 rispetto a quello del C7, mentre l'IFN- γ , che non modula la produzione del C3, riduce significativamente la secrezione del C7.

Le EC, che sono a diretto contatto con il sangue, sono potenziali bersagli delle molecole effettrici rilasciate in seguito all'attivazione del sistema del C. In particolare, le EC possono essere danneggiate o attivate dal TCC, e per evitare gli effetti nocivi esse presentano sulla loro membrana un gran numero di regolatori del C.

Fino ad oggi non è stata documentata sulla membrana delle EC la presenza di componenti del sistema del C, al di fuori dei regolatori. Nel corso delle nostre indagini, volte a valutare la sintesi e la secrezione del C7 da parte delle EC, avevamo osservato la presenza del C7 sulla membrana di queste cellule con un test ELISA. Abbiamo pertanto deciso di studiare ulteriormente l'espressione di tale proteina sulla membrana cellulare e di analizzare il suo ruolo funzionale.

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 ISOLAMENTO DELLE CELLULE ENDOTELIALI DA CORDONI OMBELICALI UMANI (HUVEC)

Le cellule endoteliali vengono isolate da vene di due o più cordoni ombelicali umani, secondo il metodo di Jaffe [61].

In breve, dopo aver rimosso l'estremità distale necrotica del funicolo, si incannula la vena da entrambe le parti con un catetere sterile, opportunamente preparato, e si lava più volte il vaso con dPBS [Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, soluzione tamponata, 137mM NaCl, 2.7mM Na₂HPO₄.2H₂O, 1.47mM KH₂PO₄, pH 7.4 (SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo.)], allo scopo di rimuovere il sangue e gli eventuali coaguli presenti al suo interno. Successivamente, si perfore il vaso con una soluzione di collagenasi CLS II da *Clostridium histolicum* (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey) allo 0.5 % in dPBS contenente 0.7mM CaCl₂ e MgCl₂ e la si lascia ad agire per 15 minuti incubando il cordone a +37°C, 5% CO₂ in termostato (Cellstar, A. De Mari, Mi, Italia).

Al termine dell'incubazione, si recupera la soluzione contenente le cellule, e si lava ripetutamente la vena con RPMI 1640 (Euroclone Ltd. UK), integrato con il 20% di New Born Calf Serum [NBCS (Euroclone Ltd. UK)], utilizzando almeno tre volumi di tampone di lavaggio per ogni volume di collagenasi impiegato.

Il tampone recuperato viene raccolto in provettoni da 50 ml e centrifugato per 10 minuti alla velocità di 250xg. Le cellule del fondello vengono poi risospese nel medium di coltura delle HUVEC, composto da Medium 199 (SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo.), integrato con 10% NBCS, 10% Foetal Calf Serum [FCS (Labtek, Eurobio, Mi, Italia)], 50 µg/ml di fattore di crescita per le cellule endoteliali (EGF, preparato da cervello di bovino, come descritto da Maciag et. al., [62]), 50 µg/ml di eparina di mucosa intestinale di

maiale (SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo.), 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomina (SIGMA Chemical Co. St. Louis, Mo.), secondo quanto descritto da Thornton et al., [63], e quindi trasferite in piastre da 25 cm² (Costar, Cambridge, MA.), precedentemente rivestite da un soluzione di gelatina al 2% (SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo.).

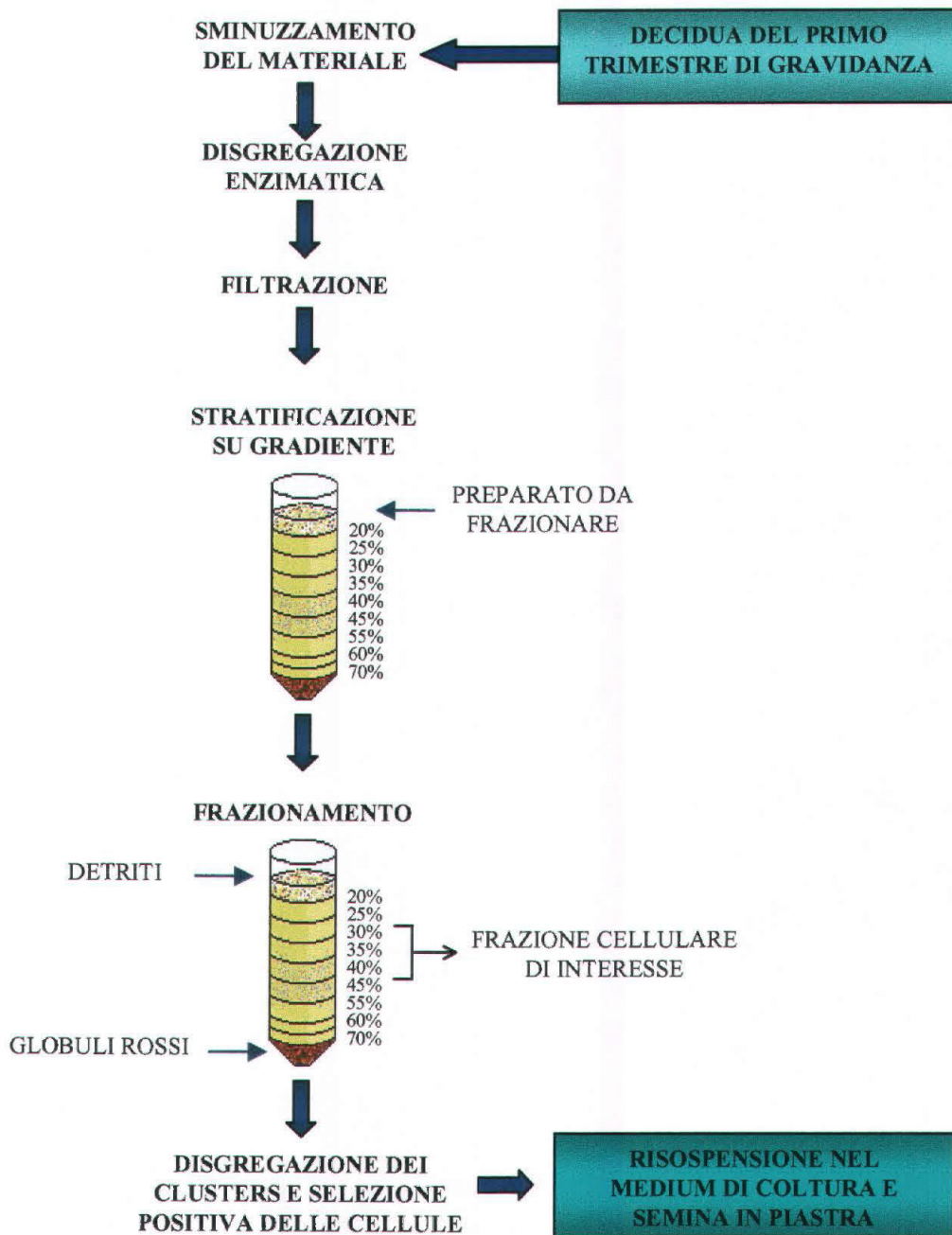
4.2.2 ISOLAMENTO DI CELLULE ENDOTELIALI DAL MICROCIRCOLO CUTANEO (ADMEC)

Le EC vengono isolate da biopsie cutanee umane, ottenute durante interventi di chirurgia plastica riduttiva, modificando il protocollo descritto da Kraling et al. [64]. In breve, il pezzo di tessuto viene immerso per un paio d'ore a temperatura ambiente in una soluzione disinfettante contenente 1000U/ml di penicillina e 0,5µg/ml di streptomina e 0,5µg/ml di fungizone (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.). Il tessuto viene lavato con dPBS e tagliato in pezzi di circa 3mm³, quindi incubato O.N. in una soluzione di dPBS contenente 0,5% di tripsina (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.). Il giorno seguente i pezzi vengono lavati con dPBS e l'epidermide viene scartata. Il derma, immerso in una soluzione di RPMI 1640 contenente 10% di NBCS (Invitrogen, MI, Italy), viene grattato con la lama di un bisturi e le cellule così raccolte centrifugate a 300xg per 5 minuti. Al termine, le cellule vengono purificate incubandole con biglie magnetiche (Oxoid M450 Epoxy) coniugate con Ulex Europaeus I (UEA-1, Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.) per 15 minuti a +4°C in rotazione. Le ADMEC ottenute vengono seminate su fibronectina 50 µg/ml (Roche, MI, Italy) in terreno di coltura composto da Medium 199 addizionato con 10% NBCS, 10% siero umano scomplementato, cAMP 25µg/ml, idrocortisone 1µg/ml, eparina 50µg/ml (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.) ed EGF 50µg/ml (preparato da cervello di bovino, come descritto da Maciag et. al., [62]).

4.2.3 ISOLAMENTO DI CELLULE ENDOTELIALI DALLA DECIDUA (DEC)

Le cellule endoteliali della decidua sono state isolate da placente del primo trimestre di gravidanza, secondo una metodica messa a punto nel nostro laboratorio [65]. Il materiale viene posto in una capsula Petri (KIMA, PD, Italy) e lavato in una soluzione di HBSS 1 (Hanks' Balanced Salts Solution) con NaHCO_3 0.35g/l, contenente penicillina 100U/ml, streptomycina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, fungizone 250ng/ml EDTA 1mM, Glucosio 5mM (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.), pH 7.4, per il riconoscimento della decidua. Il tessuto così selezionato viene poi sminuzzato in frammenti di circa 1-3 mm^3 e incubato *over night* (O.N.) a +4°C in una soluzione di 10 ml di Medium 199, contenente collagenasi I (Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey) 3 mg/ml, DNasi (Roche, MI, Italy) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, penicillina, streptomycina e fungizone 250ng/ml. Il giorno seguente si fa agire la collagenasi a +37°C (in agitazione) ancora per circa 1 ora, fino a che non si osserva macroscopicamente che la digestione è avvenuta. Al termine si blocca l'azione degli enzimi con 10% di NBCS (Invitrogen, MI, Italy) e si filtra attraverso una membrana con pori di 100 μm di diametro. Si centrifuga la soluzione contenente le cellule a 300xg per 5 minuti. Il pellet viene risospeso in 10 ml di una soluzione di lavaggio composta da RPMI 1640+10% NBCS (Invitrogen, MI, Italy) e si stratifica in un gradiente discontinuo di Percoll (PHARMACIA, sospensione madre diluita con HBSS 10X ed acqua apirogena DIACO, Italia) composto da strati che vanno da una concentrazione del 20% al 70%. Si centrifuga per 30 minuti a 670xg a +20°C. Al termine, dal gradiente discontinuo di Percoll, si recuperano le bande dal 30% al 40% [66], che vengono portate ad un volume di 50 ml con HBSS 1 e centrifugate a 500xg per 10 minuti. A questo punto le cellule vengono risospese in 1 ml di ACCUMAX (ACCUMAXTM Cell Aggregate Dissociation Medium, Bioscience), per disgregare i *clusters* cellulari eventualmente presenti, ed incubate per circa 30-40 secondi a +37°C. La reazione viene bloccata con la

soluzione di lavaggio e le cellule centrifugate per 10 minuti a 250xg. Successivamente, il pellet viene risospeso in dPBS con BSA all' 1% e si procede alla selezione positiva mediante bilie magnetiche (Oxoid M450 Epoxy) ricoperte da UEA-1 (20 minuti a +4°C in ruota). Dopo essere state sottoposte a diversi lavaggi con 2 ml di dPBS-BSA 0.1% per eliminare le eventuali cellule negative contaminanti, le cellule vengono seminate in una piastra da 12 pozzetti (Costar, Cambridge, MA) ricoperta da fibronectina 50 µg/ml (ROCHE, MI, Italy). Il terreno di coltura è composto da: Endothelial serum free medium, bFGF (20ng/ml), EGF (10ng/ml), glutammina 2mM, 100 U/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina (Invitrogen, MI, Italy) e 10% di siero di gravida.



Schema del protocollo per l'isolamento delle DEC.

4.2.4 ALLESTIMENTO DI COLTURE DI CELLULE ENDOTELIALI

Le cellule della coltura primaria vengono lasciate crescere fino a raggiungere la confluenza, quindi sono staccate mediante trattamento enzimatico con una soluzione di tripsina 0.5% - EDTA 0.2% [Etilen Diamino Tetra Acetato (SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo.)], lavate e piastrate.

In breve, dopo aver aspirato completamente il medium di coltura, si lava la piastra con alcuni millilitri di dPBS per rimuovere il siero ancora presente ed ottimizzare l'azione dell'enzima. Quest'ultimo viene aggiunto alle cellule nella minima quantità necessaria a ricoprire il fondo della piastra. La soluzione viene lasciata agire per circa un minuto a +37°C, 5% CO₂ in termostato e, successivamente, dopo aver controllato al microscopio (Carl Zeiss, Jena) l'avvenuto distacco delle cellule, se ne blocca l'azione con NBCS al 10%.

Le cellule tripsinizzate vengono recuperate e la piastra è lavata con RPMI 1640 integrato con il 20% di NBCS. Il tutto viene raccolto in una provetta e centrifugato per 10 minuti alla velocità di 250xg. Il fondello viene, infine, risospeso nel medium di coltura delle cellule endoteliali, precedentemente descritto, e le cellule sono poi piastrate. A seconda dell'esperimento che deve essere effettuato, le cellule possono venir piastrate in micropiastre per colture cellulari da 96 pozzetti (Costar, Cambridge, MA), o su Transwell (Costar, Cambridge, MA), precedentemente ricoperti di gelatina oppure su vetrini da 8 pozzetti (BD Falcon, France) e trattati dapprima con Poli L-Lisina [1 µg/ml, per 15 minuti a temperatura ambiente (SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo.)] e successivamente con gelatina.

Le cellule vengono quindi fatte crescere nuovamente fino a confluenza e poi utilizzate.

4.2.5 PREPARAZIONE DEL C5b6

L'aver a disposizione l'intermedio relativamente stabile C5b6 [3], permette di preparare il TCC usando solo componenti isolati, escludendo l'interferenza dei frammenti attivi quali C3a, C4a e C5a, che sono generati negli stadi iniziali della sequenza di attivazione complementare.

Il plasma umano viene depletato dal C7 mediante cromatografia di affinità usando Sefarosio 4B attivato con bromuro di cianogeno (SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo.) e copulato con IgG anti-C7 (antisiero di capra anti C7 umano; Quidel, San Diego, CA). Le frazioni eluite dalla cromatografia vengono controllate per la presenza di C5, C6 e C7 con ELISA Sandwich (limite di sensibilità: 1-3 ng/ml) impiegando antisieri di capra anti-C5, C6 e C7 umano (Quidel, San Diego, CA). Quelle contenenti C5 e C6 a livelli comparabili con le concentrazioni originali del plasma e C7 in quantità non misurabili vengono riunite e ricalcificate mediante l'aggiunta di 20 mM CaCl₂. Dopo rimozione del coagulo, il complemento viene attivato aggiungendo zymosan (estratto dalla parete di lievito, preparato nel nostro laboratorio autoclavando 100 g di lievito di birra risospeso in 2 litri di PBS, centrifugando a 200xg per 10 minuti e autoclavando nuovamente il fondello risospeso in 200 ml di PBS) al 5% finale ed incubando per 60 minuti a 37°C. Si procede con centrifugazione a 2000xg per 15 minuti a 4°C e dialisi del sopranatante contro tampone euglobuline (tampone fosfato 0.02 M, pH 5.4) per una notte a 4°C, in modo da far precipitare il C5b6 formatosi. Le euglobuline vengono lavate centrifugando a 2000xg per 15 minuti e risospesando il fondello in PBS.

Il complesso attivo viene quindi purificato mediante cromatografia a scambio anionico, DEAE-Sephacel (Whatman, Maidstone, Kent, UK) eluendo con gradiente di NaCl da 0.01 M a 0.5 M. Le frazioni contenenti l'attività, saggiata mediante emolisi reattiva, vengono raccolte e concentrate con Vivaspin 20 ml Concentrator 100.000 MWCO (Vivascience, Binbrook, UK).

Il materiale è stato ulteriormente purificato con cromatografia di esclusione (Ultrogel AcA 34 IBF-LKB, Mi, Italia) e fast protein liquid chromatography (FPLC® Superose 12 Pharmacia Biotech). Il C5b6 così ottenuto ha una concentrazione proteica di 800 mg/ml ed un titolo in emolisi reattiva di 250.000 U/ml.

4.2.6 PREPARAZIONE DELL'ITCC E DEL SC5b-9

Il complesso complementare terminale inattivo è stato ottenuto mescolando 3 volumi di C5b6 con un volume di C7, un volume e mezzo di C8 e quattro volumi di C9 in 50 volumi finali di PBS.

Il C7 è stato usato in leggero eccesso rispetto alla quantità richiesta per inattivare completamente l'attività emolitica del C5b6 se preincubato con quest'ultimo per 10 minuti a +37°C. Il C8 presente nella mistura era in eguale concentrazione molare rispetto al C7 ed il C9 viene usato in largo eccesso per favorirne la polimerizzazione durante l'assemblaggio del complesso.

La formazione del complesso si è ottenuta incubando la miscela per 30 minuti a +37°C e da successive due ore di incubazione a temperatura ambiente.

Il complesso SC5b-9 è stato preparato come descritto da Casarsa et al. [67] incubando il complesso C5b6 e un siero umano C5 deficiente, come fonte degli altri componenti terminali e delle proteine regolatrici vitronectina (proteina S) e clusterina.

Entrambi i complessi così formati vengono purificati mediante FPLC® attraverso colonna Superose 12, seguita da cromatografia di affinità con mAb aE11 legato ad Agarosio-Proteina G (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo.), legame reso covalente usando dimetil pimelidato di idrocloride secondo la metodica di Schneider [68]. Il complesso legato è stato eluito con 4 M guanidinio in 0.1 M sodio fosfato, pH 7 e dializzato prima contro 1 mM HCl quindi contro PBS. Durante la procedura di purificazione, l'iTCC e l'SC5b-9 sono stati controllati antigenicamente con ELISA specifico e funzionalmente

per la sua capacità di modulare l'espressione del VCAM-1 sulle cellule endoteliali.

Una colonna di agarosio-proteina G su cui era stato legato un policlonale anti-C5 è stata usata in esperimenti di adsorbimento dell'iTCC. Il C9 polimerico è stato dosato con metodo ELISA legando il mAb aE11 ai pozzetti di piastra ELISA e rivelando poi con un anticorpo policlonale anti-C9 marcato con biotina [4].

4.2.7 DOSAGGIO DELLE PROTEINE

Il contenuto proteico viene determinato con il metodo descritto da Bradford [69] che permette un dosaggio fino a 10 µg/ml. Viene allestita una curva di taratura con BSA (albumina bovina serica Sigma: frazione V pura al 96-99%) in una piastra microtiter da 96 pozzetti, in cui sono seminati 40 µl dei campioni in esame, a diverse diluizioni, e 200 µl di miscela Bradford (Coomassie Brilliant Blue G250 0.04% (w/v) Merck), Etanolo 4.7% v/v H₃PO₄ 8.5% v/v per ogni pozzetto. La presenza di proteine è indicata dallo sviluppo di un colore blu la cui assorbanza viene letta a 620 nm con un lettore per piastre (Titertek Multiskan MCC/340, FLOW LAB., Spa, Milano). La concentrazione delle proteine dei singoli campioni viene calcolata sulla base della curva standard ottenuta con la BSA.

4.2.8 ENZYME LINKED IMMUNO SORBENT ASSAY (ELISA)

Per catturare l'antigene, vengono seminati 200 µl di una soluzione contenente gli anticorpi diluiti in tampone bicarbonato (Bicarbonato di sodio 0.1 M, pH 9.6) in piastra microtiter Nunc (Denmark) maxisorp da 96 pozzetti ed incubati tutta la notte a +4°C. Per la valutazione della presenza del complesso terminale viene usato l'anticorpo monoclonale aE11, che riconosce un nuovo epitopo del C9, come già descritto in letteratura [4, 16], mentre per la presenza dei componenti C3 e C7 nei sovranatanti delle colture

cellulari, vengono impiegati anticorpi policlonali fatti in capra. La piastra viene lavata tre volte con PBS Tween20 (Phosphate Buffered Saline, 10 mM tampone fosfato, 154 mM NaCl, pH 7.4 + Polyoxyethylenesorbitan monolaurate 0.1% SIGMA) ed i siti liberi della plastica vengono bloccati incubando con PBS+BSA 2% per un'ora a +37°C.

La piastra viene lavata con PBS-Tween20 per tre volte ed incubata a +37°C con i campioni da saggiare diluiti in PBS-BSA 0.1% +Tween20 0.05%, per un'ora. Sono stati esaminati in parallelo diluizioni al raddoppio di una soluzione a concentrazione nota della molecola da ricercare.

Dopo successivo lavaggio ed incubazione per un'ora a +37°C con anticorpi anti-C5 , anti-C3 o anti-C7 marcati con biotina, diluiti in PBS-BSA 0.1%-Tween20, la piastra viene lavata tre volte ed incubata per 30 minuti con streptavidina fosfatasi 1:2000 (SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo.) in PBS-BSA 0.1% Tween20. Dopo aver lavato due volte con PBS-Tween20 ed una volta con tampone glicina (Glicina 0.1 M, pH 9.6 addizionata con 0.1 mM MgCl₂, e 0.1 mM CaCl₂), viene aggiunto il substrato PNPP (Para-Nitro-Fenil-Fosfato disodico; SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo.) sciolto nello stesso tampone alla concentrazione di 1 mg/ml.

La lettura spettrofotometrica viene effettuata a 405nm (Multiskan MCC/340 MK II) ad intervalli regolari di 15 minuti.

4.2.9 BIOTINILAZIONE DELLE IgG

Cinquanta µl di IgG vengono dializzati tutta la notte contro tampone bicarbonato (NaHCO₃ 0.1 M + NaCl 0.1 M a pH 8.8) e le proteine recuperate vengono dosate con il metodo Bradford.

La biotina (estere di N-hydroxysuccinamide, SIGMA) viene sciolta al momento in DMSO (Dimetilsulfossido, Analyticals Carlo Erba Reagenti, Italia) alla concentrazione di 10 mg/ml ed incubata per 15 minuti a

temperatura ambiente con gli anticorpi in un rapporto biotina/proteine 40:1 moli/moli (1 μg biotina/8,25 μg proteine).

La reazione viene bloccata aggiungendo un tampone di cloruro d'ammonio 1 M a pH 6.5 con rapporto di 1:100. Le proteine vengono dializzate tutta la notte a 4°C in PBS-azide per allontanare la biotina non legata.

La diluizione ottimale di utilizzo degli anticorpi biotinilati viene stabilita mediante sistema ELISA.

4.2.10 ELISA SU HUVEC

Le HUVEC, al primo passaggio, vengono fatte crescere fino a confluenza in piastre da 96 pozzetti, precedentemente gelatinati, contenenti 200 μl di medium di coltura per pozzetto.

Le cellule, incubate o meno con gli stimoli, vengono lavate delicatamente 3 volte con HBSS [Hanck's Buffered Salt Solution (SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo.)] contenente il 2% di BSA (Bovine Serum Albumine, frazione V), CaCl_2 e MgCl_2 0,7mM (SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo.), e incubate con 100 μl /pozzetto di anticorpo primario. Per lo studio dell'espressione dei componenti del C di membrana sono stati utilizzati anticorpi goat anti-human C3 e goat anti-human C7 (Quidel, San Diego, CA), biotinilati nel nostro laboratorio; mentre per l'espressione delle molecole di adesione sono stati usati gli anticorpi monoclonali anti-VCAM-1 (P3C4), anti-ELAM (P2H3) (Chemicon, Temecula, CA) e anti-ICAM-1 (6.5B5) (DakoCytomation, Denmark, A/S). Tutti gli anticorpi primari vengono diluiti nella soluzione per i lavaggi alla concentrazione finale di 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ed incubati per 1 ora a +37°C.

Dopo 3 lavaggi, il legame dell'anticorpo primario viene rivelata mediante un anticorpo policlonale anti IgG di mouse o con streptavidina coniugati con la fosfatasi alcalina (SIGMA Chemical Co., St.Louis, Mo.) diluiti 1:4000 nella soluzione di lavaggio, e incubati 30 minuti a +37°C.

L'anticorpo non legato viene quindi lavato via e l'enzima viene fatto reagire con il substrato PNPP [paranitrofenilfosfato (SIGMA Chemical Co., St. Louis, Mo.)] (1mg/ml).

L'analisi colorimetrica viene effettuata con un lettore ELISA Titertek Multiskan (Flow Laboratories, Milano, Italia), alla lunghezza d'onda di 405 nm.

4.2.11 IMMUNOFLUORESCENZA

Le cellule endoteliali vengono coltivate fino a confluenza su vetrini da otto pozzetti (BD Falcon, France). Le cellule sono lavate delicatamente per due/tre volte con 500 μ l di dPBS contenente 0,7 mM di CaCl_2 e MgCl_2 e il 2% di BSA, e fissate per 15 minuti al buio, a temperatura ambiente, con 150 μ l di paraformaldeide diluita al 1% in dPBS integrato con il 2% di saccarosio. Le cellule vengono quindi incubate con l'anticorpo primario policlonale goat anti-C7 o anti-C3 coniugato con la biotina, diluito nella stessa soluzione utilizzata per i lavaggi, 12 ore a +4°C, e successivamente, dopo 3 lavaggi come descritti sopra, incubate con la streptavidina coniugata con la fluoresceina (DakoCytomation, A/S, Denmark), al buio, e per 30 minuti a temperatura ambiente. Infine, dopo ulteriori 3 lavaggi, il vetrino viene montato con VECTASHIELD, medium montante per stabilizzare la fluorescenza (Vector Laboratoires, Inc., Burlingame, U.S.A).

Le cellule così preparate, vengono esaminate e fotografate con il microscopio a fluorescenza (Carl Zeiss, Jena, Germany).

4.2.12 MICROSCOPIA ELETTRONICA A TRASMISSIONE (TEM)

HUVEC cresciute fino alla confluenza in vetrini da 8 pozzetti (BD Falcon, France) vengono fissate in glutaraldeide allo 0,5% in 0,1M di cacodilato di sodio per 5 min a temperatura ambiente, lavate in cacodilato di sodio e incubate con un anticorpo monoclonale anti-C7 (WU 4-15) (gentilmente

donato dal Prof. Wuerzner, University of Innsbruck, Austria) o con un anticorpo monoclonale anti-C3 (Quidel, San Diego, CA) 1:50 in dPBS contenente 0,5% di BSA O.N. a +4°C. Le cellule sono successivamente lavate 3 volte con dPBS+0,5% BSA e incubate quindi per 30 min a temperatura ambiente. con gli anticorpi anti-mouse marcati con la biotina (1:100). Dopo altri 3 lavaggi le cellule sono incubate con streptavidina marcata con particelle di 20 nm di oro colloidale (1:100) (British Biocell International, Cardiff, UK). Dopo ulteriori lavaggi con la soluzione di cacodilato di sodio, le cellule vengono fissate prima con glutaraldeide al 2% in dPBS, e poi con 0.5% di tetrossido di osmio nella stessa soluzione. Le cellule vengono quindi lavate diverse volte con acqua milliQ, e sviluppate con il silver-enhancing kit HQ (Nanoprobes, Yaphank, NY) per 8 min al buio. Infine, le cellule sono disidratate serialmente in etanolo, infiltrate con ossido di propilene e incluse in DERR 332 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Le sezioni vengono tagliate usando un ultramicrotomo (Leika Ultracut UCT) e colorate con l'acetato di uranile. I campioni vengono osservati con il microscopio elettronico a trasmissione Philips EM 208 (Philips, Eindhoven, The Netherlands).

4.2.13 IMMUNOISTOCHEMICA SU SEZIONI CONGELATE

La procedura qui di seguito descritta è stata adoperata sia su sezioni congelate di decidue provenienti da gravidanze normali che su biopsie cutanee, ed è stata eseguita facendo uso del Vectastain Universal *Elite* ABC Kit (VECTOR Laboratories, Inc., Burlingame, CA.), uno dei sistemi di immunoperossidasi più sensibili.

Prima di procedere alla colorazione dei preparati, questi vengono lasciati ad asciugare a temperatura ambiente per 30 minuti, quindi sono idratati con dPBS per alcuni minuti. Da questo momento in poi, tutti i passaggi vengono

eseguiti a temperatura ambiente, tenendo i vetrini in camera umida per evitare l'evaporazione dei reagenti.

Inizialmente, i preparati circoscritti con la penna vetrografica, vengono fissati per 15 minuti a temperatura ambiente con paraformaldeide al 3%, e qualora l'antigene ricercato sia interno alla cellula, permeabilizzati con Fix & Perm (PERMEABILIZATION MEDIUM B, CALTAG Laboratories by An Der Grub Bio Research GmbH, Austria) sempre per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo ogni passaggio, si effettuano due lavaggi di 5 minuti ciascuno con dPBS. Se richiesta l'eliminazione della perossidasi endogena, la sezione deve venire incubata per 30 minuti con lo 0,3% di H₂O₂ (perossido di idrogeno, PROLABO, Paris, France)

Successivamente, dopo un lavaggio con dPBS per 5 minuti, si bloccano gli eventuali siti aspecifici dell'anticorpo primario, aggiungendo ad ogni vetrino siero di cavallo, fornito dal kit, che viene incubato a temperatura ambiente per 30 minuti. Dopo aver eliminato l'eccesso di siero, i preparati vengono quindi incubati con l'anticorpo monoclonale mAb anti-C7 1:50 diluito in dPBS e poi, con l'anticorpo secondario biotinilato, diluito in dPBS e siero bloccante. I tempi d'incubazione sono rispettivamente di un'ora e di 30 minuti a temperatura ambiente, e alla fine i preparati vengono lavati due volte.

Il passaggio successivo prevede un'incubazione per 30 minuti con una soluzione contenente avidina DH e perossidasi di rafano (AEC SUBSTRATE KIT FOR PEROXIDASE, VECTOR Laboratoires, Inc., Burlingame, CA.). Il sistema avidina/biotina sfrutta la capacità dell'avidina, una glicoproteina di 68 kDa, di legare in modo pressochè irreversibile la biotina, permettendo così la formazione di complessi macromolecolari stabili in cui le molecole di avidina fungono da ponti tra gli enzimi secondari e le molecole di perossidasi biotinilate. La perossidasi legata a tali complessi viene rivelata usando la DAB (3,3' DIAMINOBENZIDINE TABLET SETS Peroxidase Substrate, SIGMA Chemical Company, St. Louis, Mo), un substrato che in presenza di H₂O₂ e

perossidasi, precipita producendo un'intensa colorazione marrone. La reazione di ossidazione del substrato è bloccata alcuni minuti dopo il suo inizio, sciacquando i vetrini con acqua.

I preparati sono quindi controcolorati con ematossilina (EMALLUME DI MAYER, E. MERCK, D-6100 Darmstadt, F.R., Germany) e si lasciano poi sotto l'acqua corrente per 10-15 minuti per rimuovere l'eccesso di colorante. Infine si montano con EUKITT (O. Kindler, GmbH & Co., Freiburg, Germany), medium montante, per essere osservati al microscopio (Carl Zeiss, Jena).

4.2.14 BIOTINILAZIONE DELLA MEMBRANA DELLE HUVEC

HUVEC fatte crescere fino alla confluenza in flasks da 75-cm² (BD Biosciences Discovery Labware, Milan, Italy) sono lavate 3 volte con dPBS e marcate con sulfosuccinilmidyl 6-(biotinamido) hexanoate (Pierce, Rockford, IL) per 15 min a temperatura ambiente. Le cellule sono quindi lavate con dPBS e incubate con una soluzione lisante: 0,5% Triton X-100, Tris NaCl 10 mM, NaCl 150mM, protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), per 15 min a +4°C. Il lisato viene centrifugato a 12000RPM per 40 min a +4°C ed il sovrnatante viene recuperato, dializzato contro dPBS ed utilizzato.

4.2.15 PURIFICAZIONE MEDIANTE COLONNA CROMATOGRAFICA DI AFFINITÀ'

La colonna di immunoaffinità anti-C7 è stata preparata copulando le IgG anti-C7 prodotte in capra con il CNBr-Sepharose 4B (Sigma-Aldrich), che era stato precedentemente lavato 3 volte con HCl 1 mM, attraverso l'incubazione overnight in rotazione a +4 °C. Dopo aver bloccato i siti di legame rimasti liberi con Tris-HCl 0.1 M pH 8.3, le biglie di sefarosio sono lavate ed equilibrate con una soluzione di Tris-HCl 10 mM pH 7.4 contenente 0.14 M NaCl. Nella colonna vengono fatti passare circa 120 ml di sovrnatante di

HUVEC oppure il lisato cellulare ad una velocità di 10 ml/hr ed il C7 legato viene eluito con guanidinio-HCl 4 M (Sigma-Aldrich) in 0.1 M fosfato di sodio a pH 7.4 contenente 2 M NaCl. Prima dell'utilizzo il C7 staccato viene dializzato 12 ore a +4°C contro dPBS.

4.2.16 SDS-PAGE ED IMMUNOBLOTTING

Il C7 purificato mediante colonna di immunoaffinità, derivante sia dal sovrantante di coltura che dalle membrane cellulari lisate, viene fatto correre in un SDS-PAGE. L'elettroforesi è stata allestita secondo il metodo di Laemmli [70] con un gel di 1.5mm di spessore. Dopo la corsa elettroforetica in Vertical Slab Gel Electrophoresis Cell (Hoefer, S. Francisco, USA) di circa 2 ore a 150V e 20mA il gel viene lasciato per 10 minuti nel tampone rigenerante in agitazione a temperatura ambiente e, successivamente, trasferito su nitrato di cellulosa in Western blot Semi-phor (Hoeffer scientific instruments S.F. USA) a 0,8mA per cm² per 90 minuti in tampone di trasferimento. Il nitrato viene saturato con TBS-skin-milk 4% per una notte a +4°C. Dopo saturazione, la membrana viene lavata tre volte in TBS-Tween 20 0.1% e, in seguito, incubata un'ora a +37°C con l'anticorpo policlonale goat anti-C7 coniugato con la biotina diluito 1:1000 in TBS-S.M. 0.1%-Tween 20 0.1. Dopo tre lavaggi con TBS-Tween20 0.05%, la striscia di nitrocellulosa viene incubata con la streptavidina coniugata con la fosfatasi alcalina 1:4000, per 30 minuti a +37°C. Infine si lava abbondantemente con TBS-Tween 20 0.1%, quindi una volta con il tampone per la fosfatasi alcalina, e si aggiunge il substrato precipitante per la fosfatasi, costituito da 0.3mg/ml di BCIP e da 0.6mg/ml di NBT in tampone per la fosfatasi alcalina (0.1 M Tris-HCl pH 9.5 contenente 0.1 M NaCl and 5 mM MgCl₂). Rainbow RPN 756 (Amersham Italia Srl) è stato usato come marker di peso molecolare. La reazione di sviluppo viene bloccata con brevi lavaggi in acqua e la striscia viene lasciata asciugare all'aria.

Le proteine residue nel gel di acrilamide vengono evidenziate mediante la colorazione con blue coomassie. Il gel viene incubato per 2-3 ore con una soluzione di Brilliant blue G250 allo 0.1% in metanolo 30% e acido acetico 10%, quindi decolorato con una soluzione contenente la stessa percentuale di metanolo ed acido acetico.

4.2.17 ACID STRIP

Per capire se il C7 presente sulla membrana delle HUVEC sia veramente una proteina di membrana o sia legato ad un ipotetico recettore, si è seguita la metodica descritta da Haigler [71].

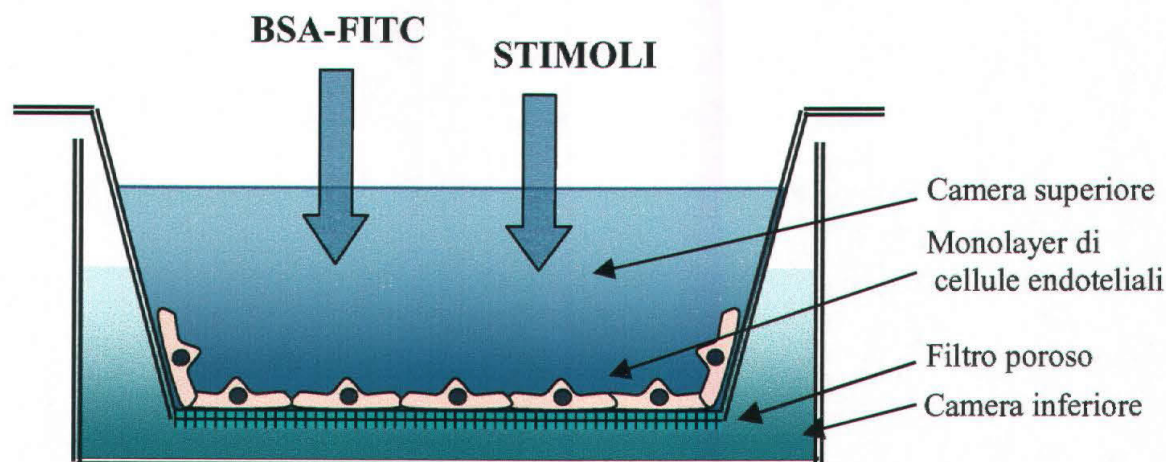
Le cellule endoteliali sono fatte crescere fino al raggiungimento della confluenza in piastre da 96 pozzetti (Costar, Cambridge, MA). Sono state quindi lavate due volte con una soluzione di dPBS contenente 2% BSA e 0,7 mM di CaCl_2 e MgCl_2 e incubate con le soluzioni di acetato di sodio 0.2M +NaCl 150mM a pH 2.5, 3.5 o 7.5 per 6 min a +4°C. L'acidità dei sovranatanti viene poi neutralizzata aggiungendo 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ di Tris 1M a pH 9. Le cellule vengono inoltre sottoposte ad alta forza ionica, incubandole sempre per 6 min a +4°C con dPBS contenente KCl 1M o KCl 3M. Successivamente le HUVEC vengono lavate e la presenza del C7 di membrana è rivelata con il metodo dell'ELISA su cellule, dopo averle fissate per 15 min al buio con PAF all'1%.

4.2.18 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI IL-8

Le HUVEC, di primo passaggio, vengono fatte crescere fino alla confluenza in piastre da 96 pozzetti e vengono incubate per 12-15, ore a 37°C 5% CO_2 , formando il complesso terminale sul C7 di membrana e con il TCC (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) o con solo il medium. Successivamente viene prelevato il sopranatante delle cellule e viene quantificata la produzione di IL-8 usando un kit ELISA commerciale specifico (Biosource International, Camarillo, CA).

4.2.19 VALUTAZIONE IN VITRO DELLA PERMEABILITÀ ENDOTELIALE

Le 2×10^4 HUVEC vengono seminate sul filtro di policarbonato del Transwell system (6.5-mm diameter, 3- μ m pores; Costar), precedentemente gelatinato. I filtri così preparati vengono usati 5 giorni dopo la semina [43]. La formazione di un monolayer perfettamente confluyente ed intatto su ogni Transwell viene monitorata aggiungendo nella camera superiore albumina bovina fluoresceinata (BSA-FITC), in concentrazione pari a 1 mg/ml, e misurando la quantità di albumina passata nella camera inferiore del sistema, utilizzando il Fluostar (SLT-Labinstruments Ges.m.b.H., Grödig, Austria). I Transwells vengono usati solamente quando la quantità di BSA passata nella camera inferiore è trascurabile; in tal caso anche gli stimoli vengono aggiunti nella camera superiore e la fluorescenza presente nella camera inferiore viene valutata a diversi intervalli di tempo.



Schema del modello Transwell per la valutazione in vitro della permeabilità endoteliale

4.2.20 ANALISI STATISTICA

I risultati sono stati espressi come media \pm SD. I dati sono comparati con ANOVA usando l'analisi post-hoc per comparare i dati ottenuti da due o più gruppi rispettivamente con il test t corretto di Fisher. I valori di $P < 0.05$ sono considerati statisticamente significativi.

4.3 RISULTATI

4.3.1 PRODUZIONE E PRESENZA DEL C7 SULLA MEMBRANA DELLE HUVEC

Dati precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio [48] indicano che le HUVEC rappresentano un importante sito extraepatico di sintesi del C7 solubile. Queste cellule sono infatti capaci di secernere C7 e C3 in quantità paragonabile, che risulta essere pari a $11 \text{ ng}/10^6$ cellule per il C7 e $9 \text{ ng}/10^6$ cellule per il C3.

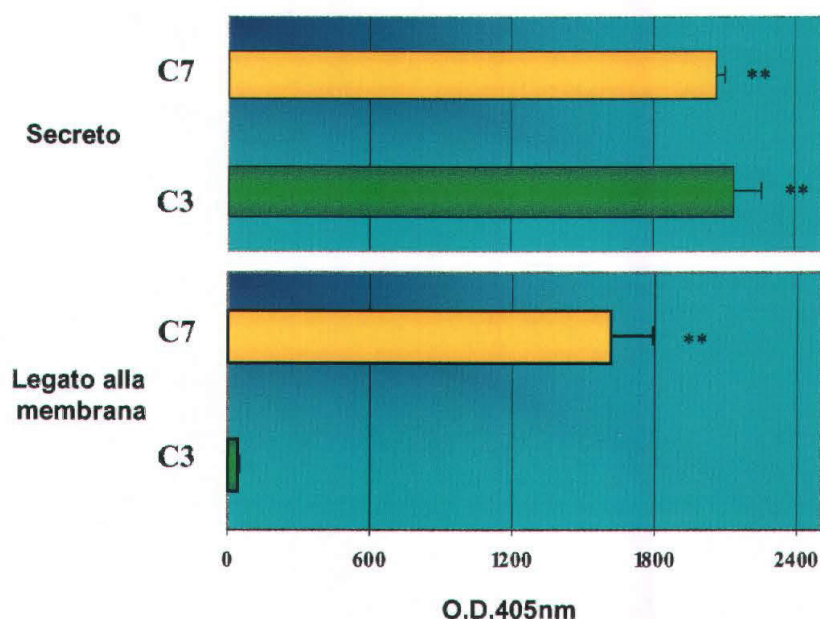


Figura 8. Presenza del C7 e del C3 nel sovrinatante e sulla membrana delle HUVEC. Le HUVEC vengono coltivate fino al raggiungimento della confluenza in piastre da 96 pozzetti. Il sovrinatante viene raccolto e la presenza del C3 e del C7 solubili viene valutata mediante ELISA (pannello superiore). I componenti presenti sulla membrana cellulare vengono analizzati mediante ELISA su cellule (pannello inferiore). ** $P < 0.01$

Come rappresentato dal grafico nella Fig. 8, le cellule endoteliali rilasciano nel sopranatante di coltura notevoli quantità sia di C3 che di C7, dosate mediante ELISA. Per valutare l'espressione dei componenti sulla membrana cellulare, le cellule sono state fatte crescere fino alla confluenza in piastre da 96 pozzetti, e la presenza dei due componenti è stata analizzata mediante ELISA su cellule. Gli anticorpi policlonali biotinilati anti-C3 e anti-C7

vengono incubati per 1 ora a +37°C sul monolayer di HUVEC abbondantemente lavato. Il legame dell'anticorpo primario viene rivelato incubando le cellule per 30 minuti a +37°C con la streptavidina coniugata con l'enzima fosfatasi, seguita da 3 lavaggi e dall'incubazione con la soluzione di PNPP. I risultati presentati nel grafico inferiore della Fig. 8 dimostrano che le HUVEC presentano sulla membrana cellulare il componente C7, mentre il C3 non è rilevabile.

La presenza del C7 sulle HUVEC è stata documentata anche mediante immunofluorescenza. Le cellule sono fatte crescere su vetrini da 8 pozzetti, preventivamente rivestiti da poli-L-lisina e da gelatina bovina al 2%. Il monolayer di cellule è stato lavato e fissato con PAF al 1% per 15 minuti al buio. La presenza del C7 e del C3 è stata valutata incubando le cellule con anticorpi monoclonali anti-C7 e anti-C3 O.N. a +4°C. Il legame dell'anticorpo primario viene rivelato usando un anticorpo secondario coniugato con la fluoresceina. Come risulta chiaro dalla Fig. 9, le cellule risultano positive in modo diffuso su tutta la membrana per il C7, mentre sono completamente negative per il C3.

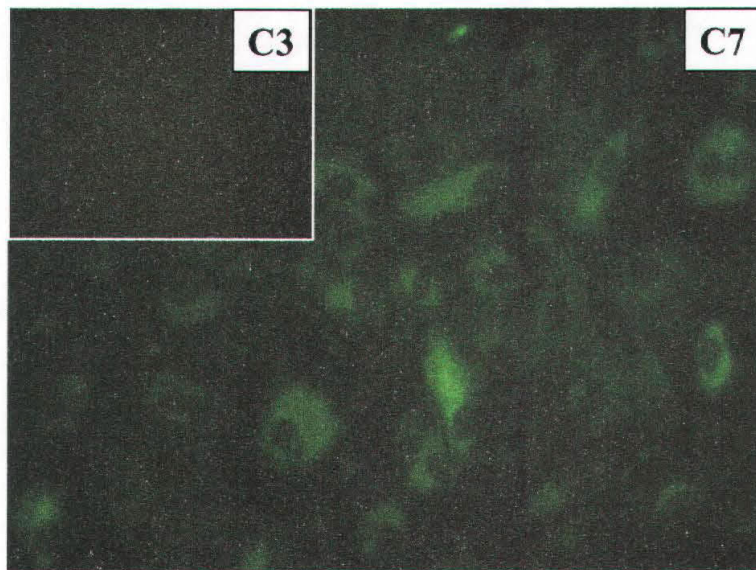


Figura 9. Immunofluorescenza. Le HUVEC coltivate fino alla confluenza in vetrini da 8 pozzetti vengono fissate e incubate con anticorpi monoclonali anti-C3 o anti-C7 O.N. a +4°C. Il legame dell'anticorpo primario viene rivelato utilizzando un anticorpo secondario marcato con fluoresceina. L'osservazione è fatta con un microscopio a fluorescenza (Carl Zeiss, Jena). Ingrandimento 500X.

Un'ulteriore conferma della presenza del componente C7 sulla membrana delle HUVEC è data dall'analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM). Le cellule sono state fatte crescere fino alla confluenza su vetrini di plastica da 8 pozzetti, precedentemente polilisinati e gelatinati. Dopo vari lavaggi le cellule vengono fissate ed incubate per 12 ore a +4°C con gli anticorpi primari monoclonali anti-C3 e anti-C7 diluiti 1:50. Il legame dell'anticorpo viene rivelato incubando con anticorpi anti-mouse biotinilati per 1 ora a temperatura ambiente, e successivamente con streptavidina coniugata con particelle d'oro colloidale di 20 nm di diametro. Le cellule vengono poi incluse in resina e le sezioni semifini vengono osservate al microscopio elettronico. Come risulta in Fig. 10 le particelle d'oro sono presenti solamente nella membrana delle HUVEC incubate l'anticorpo anti-C7, a testimoniare la presenza di tale componente sulla superficie cellulare. La distribuzione del C7 è uniforme su tutta la membrana, mentre il C3 risulta completamente assente.

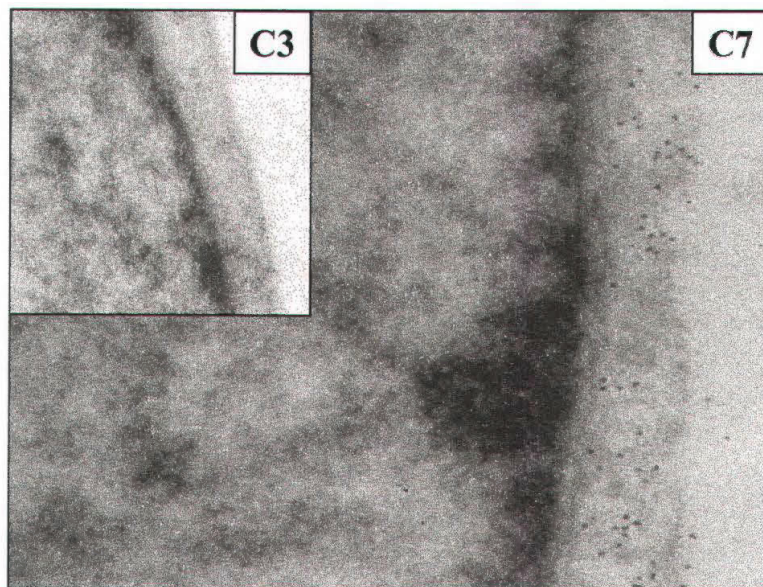


Figura 10. Immunogold. Le HUVEC sono fatte crescere su vetrini di plastica da 8 pozzetti. Le cellule sono fissate e la presenza dei componenti complementari viene rivelata mediante anticorpi monoclonali seguiti da anticorpi secondari biotinilati e successivamente da streptavidina marcata con particelle d'oro colloidale da 20nm. Il campione viene incluso in resina e le sezioni osservate al microscopio elettronico a trasmissione. Ingrandimento 56000X.

4.3.2 PRESENZA DEL C7 IN DIVERSI DISTRETTI TISSUTALI

La presenza del C7 sulla membrana delle HUVEC ci ha indotti a studiare la presenza di tale componente anche sulle EC di organi dove l'endotelio gioca un ruolo particolarmente importante come il derma cutaneo e la decidua. Per tale analisi siamo andati a vedere la distribuzione del C7 mediante immunistochemica sia su sezioni congelate sia sulle EC isolate dal tessuto.

Le sezioni della decidua e del derma cutaneo, dopo la fissazione, sono state incubate con l'anticorpo monoclonale anti-C7, ed il legame è stato visualizzato con un secondario marcato con la biotina. Lo sviluppo della colorazione delle cellule positive avviene grazie all'utilizzo della streptavidina marcata con la perossidasi che reagisce con il substrato DAB. Le cellule isolate dalla decidua (DEC) e dal derma (ADMEC) vengono invece fatte crescere su di un vetrino da 8 pozzetti ed incubate, successivamente alla fissazione, con l'anticorpo monoclonale anti-C7. Il legame viene poi rivelato usando l'anticorpo secondario marcato con la fluoresceina.

Come risulta evidente dalla Fig. 11, i vasi del microcircolo cutaneo presentano una debole positività per il C7 (A) mentre le ADMEC, analizzate al microscopio a fluorescenza (B), presentano una marcata positività diffusa su tutta superficie cellulare. Anche i vasi della decidua (C) sono risultati positivi per il C7, e anche le DEC isolate mostrano una spiccata positività per il C7 (D).

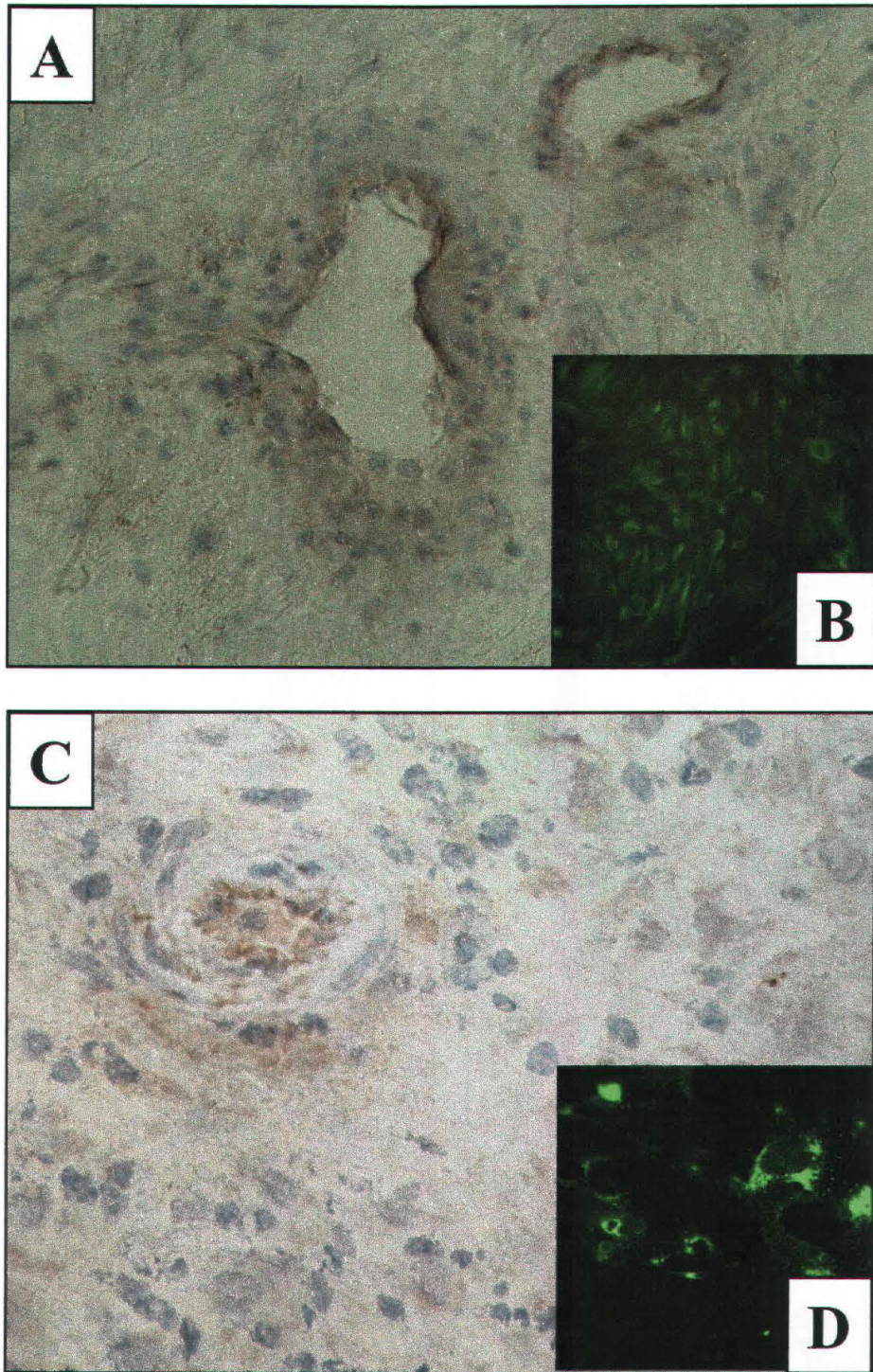


Figura 11. Distribuzione del C7. Immunoperossidasi sulle sezioni di derma cutaneo (A) e della placenta del primo trimestre (C) ottenuta incubando le sezioni con anticorpi monoclonali anti-C7 (250X). Le EC isolate dal microcircolo cutaneo (B) e dalla decidua (D), cresciute fino alla confluenza in vetrini da 8 pozzetti, vengono incubate con anticorpi monoclonali anti-C7, seguiti da anticorpi secondari marcati con la fluoresceina (250X inserto B; 750X inserto D).

4.3.3 PURIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEL C7 ESPRESSO SULLA MEMBRANA

Poiché, i risultati finora ottenuti dimostrano che il C7 è presente sulla membrana delle EC, abbiamo voluto isolare la proteina e confrontarla con quella solubile. A tal fine, il lisato cellulare delle HUVEC, la cui membrana era stata marcata con un derivato idrosolubile della biotina, ed il sovrinatante delle cellule sono stati purificati attraverso una colonna di affinità anti-C7. Il materiale ottenuto è stato visualizzato mediante Western blotting.

Dalla Fig. 12 appare evidente che sia incubando con la sola streptavidina sia con l'anticorpo anti-C7, si ottengono delle bande di peso molecolare paragonabile a quelle ottenute dal sovrinatante e dal siero umano normale (NHS) corrispondenti al peso molecolare del C7.

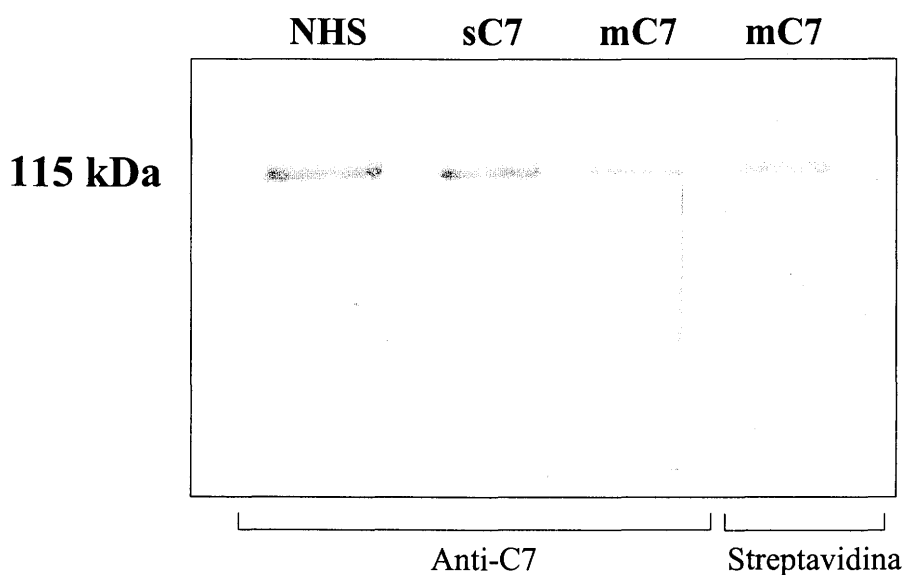


Figura 12. Western blotting. Il C7 purificato dal sovrinatante (sC7) e dal lisato cellulare (mC7), proveniente sia delle cellule biotilate sia da quelle non trattate, e del siero umano normale (NHS), è stato fatto correre in SDS-PAGE e trasferito sulla membrana di nitrocellulosa. Lo sviluppo è stato fatto usando sia l'anticorpo policlonale coniugato con la biotina sia con solo la streptavidina legata all'enzima fosfatasi alcalina.

4.3.4 IL C7 È COVALENTEMENTE LEGATO ALLA MEMBRANA DELLE HUVEC

Avendo osservato che il C7 è presente sulla membrana delle HUVEC, ci siamo chiesti se il legame vedesse coinvolto un qualche recettore, o se il componente potesse essere una proteina realmente costituente la membrana. A tal fine le cellule coltivate fino alla confluenza in piastre da 96 pozzetti, dopo essere state lavate abbondantemente, sono state trattate per 6 min a +4°C con diversi pH e con soluzioni ad alta forza ionica.

Nessun trattamento ha indotto una significativa diminuzione dell'espressione del C7 sulla membrana (Fig. 13), a testimonianza del fatto che la molecola è legata in modo covalente alla superficie cellulare.

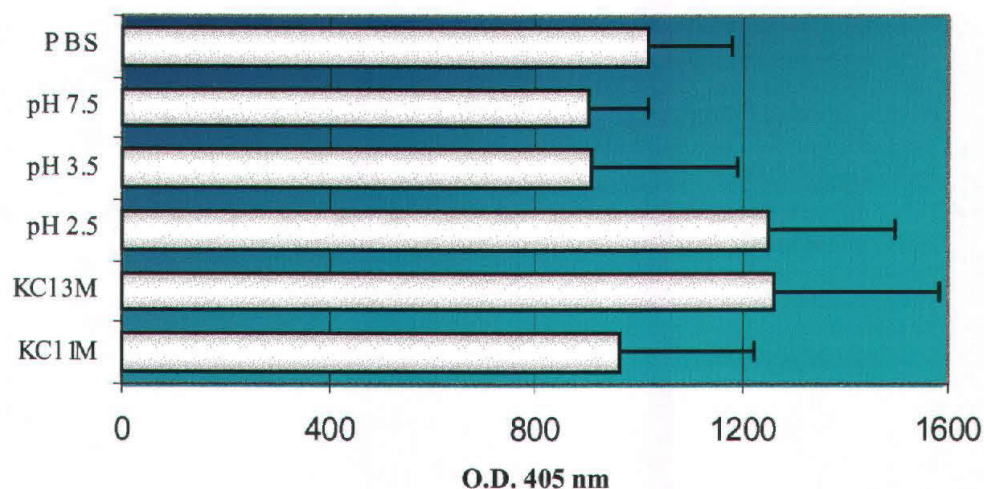


Figura 13. Trattamento con alta forza ionica e “acid strip”. Le HUVEC, cresciute fino alla confluenza in piastra da 96 pozzetti, sono state trattate per 6 min. a +4°C con soluzioni di dPBS contenenti KCl 1M o 3M, o con acetato di sodio a diversi pH o con dPBS, come controllo. Le cellule sono state lavate e fissate, ed il C7 presente sulla membrana è stato valutato mediante ELISA su cellule.

4.3.5 MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL C7 DI MEMBRANA E DEL C7 SOLUBILE DA PARTE DI CITOCHINE

Dati ottenuti nel nostro laboratorio avevano già dimostrato che il C7 secreto viene modulato da diverse citochine [48]. Quindi, siamo andati a valutare quale fosse l'effetto degli stessi stimoli sul C7 di membrana. A tal fine le cellule, cresciute fino alla confluenza in piastre da 96 pozzetti, sono state trattate con TNF- α , IFN- γ e IL-1 α per 12 ore a +37°C. Quindi è stato raccolto il sovrinatante e la quantità di C7 secreto è stata calcolata mediante ELISA, mentre la variazione dell'espressione del C7 di membrana è stata valutata con ELISA su cellule.

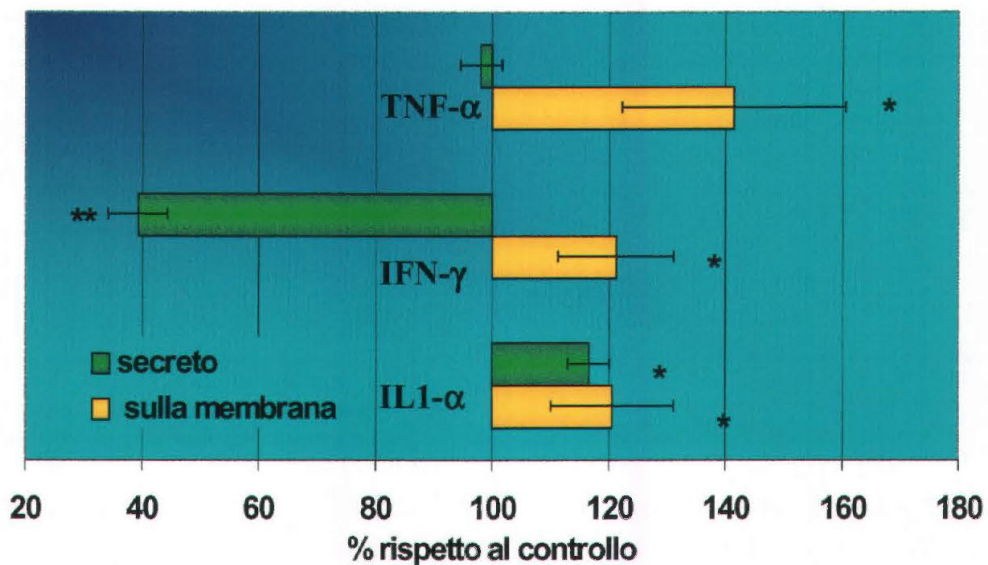


Figura 14. Modulazione del C7 secreto e di membrana da parte di citochine. Le HUVEC fatte crescere fino alla confluenza in piastre da 96 pozzetti sono trattate per 12 ore a +37°C con TNF- α 200 U/ml IFN- γ 100 U/ml, e IL-1 α 10 U/ml. Il sovrinatante viene raccolto e la presenza del C7 viene calcolata mediante ELISA. Il C7 di membrana è valutato mediante ELISA su cellule. I risultati sono espressi come percentuale del controllo non stimolato. *P<0.01; **P<0.05

Come risulta dalla Fig. 14, il C7 di membrana è diversamente modulato rispetto al C7 solubile. In particolare il TNF- α induce un aumento

dell'espressione del C7 di membrana e non ne modula la secrezione. Al contrario l'IFN- γ induce una notevole diminuzione della sintesi del C7 solubile ed un incremento dell'espressione del C7 di membrana.

L'IL-1 α sembra non avere un diverso effetto sulle due molecole in quanto aumenta l'espressione di entrambe.

4.3.6 IL C7 DI MEMBRANA CONTRIBUISCE ALLA FORMAZIONE DEL COMPLESSO TERMINALE

Per esaminare il ruolo del C7 di membrana, la prima ipotesi presa in considerazione è stata quella di valutare se tale molecola mantenesse la capacità che ha il C7 solubile di legare il C5b6 e gli altri componenti terminali del C, portando alla formazione del complesso terminale. Abbiamo quindi incubato le cellule endoteliali, cresciute fino alla confluenza in piastre da 96 pozzetti, con il C5b6, il C8 ed il C9 e la formazione del complesso terminale è stata valutata mediante ELISA su cellule. Per dimostrare la specificità del legame degli altri componenti sul C7 di membrana le cellule sono state incubate con anticorpi policlonali anti-C7 prima dell'aggiunta dei componenti.

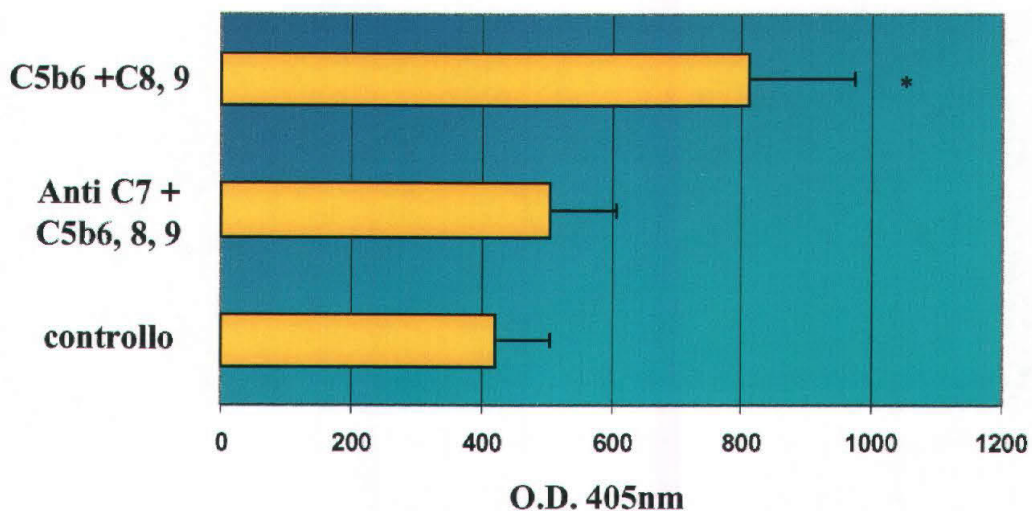


Figura 15. Valutazione della capacità del C7 di membrana di formare il complesso terminale. Le HUVEC, raggiunta la confluenza in piastre da 96 pozzetti, vengono incubate con 2µg di C5b6 per 10 min. a +37°C e successivamente vengono aggiunti 1µg di C8 e 2µg di C9 per 2 ore a +37°C. In alcuni pozzetti le cellule vengono preincubate per 25 min a +37°C con l'anticorpo policlonale anti-C7 (20µg/ml) prima dell'aggiunta dei componenti. La formazione del complesso terminale sul C7 di membrana (mTCC) è valutata mediante ELISA su cellule, utilizzando un anticorpo monoclonale che riconosce un neo epitopo esposto sul C9 polimerizzato. *P<0.05

Come rappresentato dalla Fig. 15, il C7 di membrana è risultato essere capace di formare il complesso terminale sulla membrana delle HUVEC e, poiché l'anticorpo anti-C7 inibisce tale assemblaggio, è evidente che i componenti si legano specificamente sul C7 e non in altri siti presenti sulla membrana.

4.3.7 IL C7 DI MEMBRANA FUNGE DA “DECOY ACCEPTOR” PER GLI ALTRI COMPONENTI TERMINALI

Avendo dimostrato che il C7 di membrana è capace di legare gli altri componenti formando il complesso terminale sulla membrana (mTCC), ci siamo chiesti quale ruolo potesse avere questa molecola. Come primo passo siamo andati a vedere se la formazione del mTCC sul C7 inducesse l'attivazione delle cellule, in quanto il complesso terminale del C citotolicamente inattivo (iTCC) esercita un effetto proinfiammatorio sulle cellule endoteliali portando all'espressione delle molecole di adesione quali VCAM-1, ELAM e ICAM-1 [16].

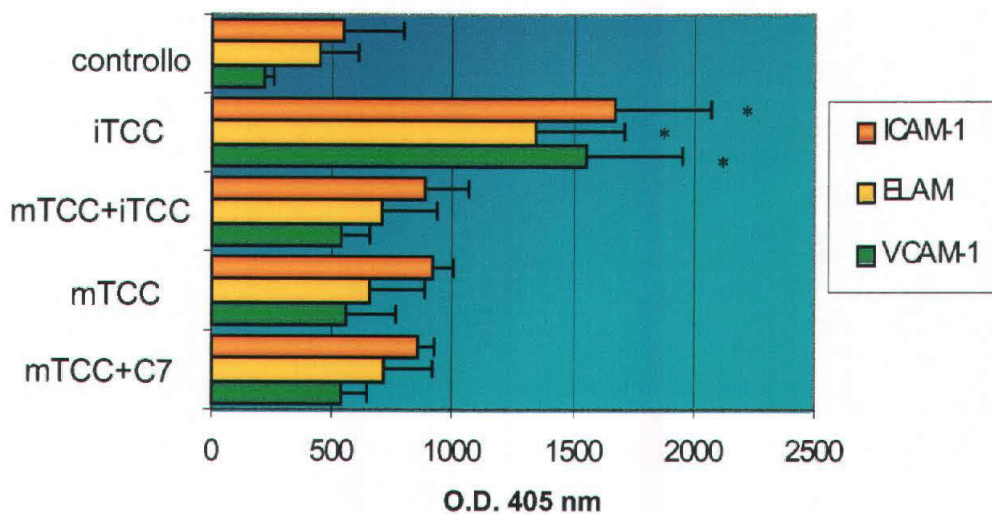


Figura 16. Espressione delle molecole di adesione. Le HUVEC, fatte crescere fino alla confluenza in piastre da 96 pozzetti, vengono stimulate con l'iTCC (5µg/ml), da solo o in presenza del complesso terminale assemblato sul C7 di membrana (mTCC). In alcuni pozzetti 1µg di C7 solubile viene aggiunto successivamente alla formazione del mTCC. L'espressione delle molecole di adesione viene valutata mediante ELISA su cellule impiegando anticorpi monoclonali diretti contro VCAM-1, ICAM-1 (dopo 12 ore di stimolazione) ed ELAM (dopo 4 ore di stimolazione). * P<0.05

L'iTCC, come ci si aspettava, è risultato essere capace di indurre l'espressione delle molecole di adesione, mentre il mTCC, formato aggiungendo alle HUVEC il C5b6, il C8 ed il C9, non ne provoca alcun aumento significativo, nemmeno se il componente C7 solubile viene aggiunto

subito dopo la formazione del mTCC. Il risultato che ci ha impressionato maggiormente è stato quello ottenuto facendo formare prima il mTCC, e aggiungendo successivamente l'iTCC. Come risulta evidente dalla Fig. 16 l'assemblaggio del complesso che utilizza il C7 di membrana causa una inibizione dell'espressione delle molecole di adesione indotta dalla stimolazione con l'iTCC, come se le cellule fossero protette contro lo stimolo proinfiammatorio esercitato dall'iTCC.

In considerazione del fatto che il C7 di membrana funge da sito di formazione del TCC e che questo porta al blocco dell'espressione delle molecole di adesione provocato dall'iTCC, ci siamo chiesti se il complesso formato sulla membrana potesse inibire anche la secrezione di citochine, come la IL-8, normalmente sintetizzate dalle EC in seguito a stimolazione da parte dall'iTCC. A tale fine il sovrinatante delle cellule stimulate con l'iTCC, dopo aver formato il complesso sul C7 di membrana, è stato raccolto e la quantità di IL-8 presente è stata valutata mediante ELISA.

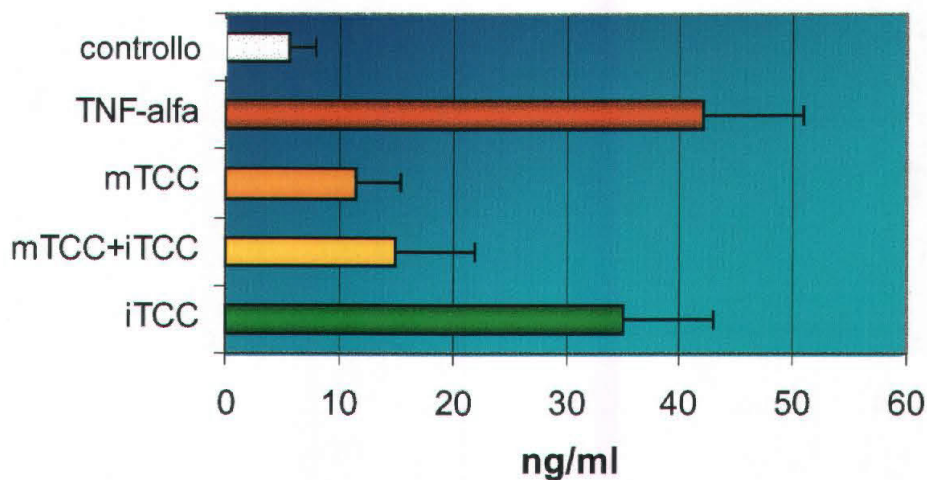


Figura 17. Sintesi di IL-8. La quantità di IL-8 presente nel sovrinatante delle HUVEC stimulate per 12 ore a +37°C con 0,5 µg/ml di iTCC, in presenza o meno del mTCC, o con 200 U/ml di TNF-α, come controllo positivo, è stata misurata mediante ELISA.

Anche in questo caso, come era risultato dallo studio dell'espressione delle molecole di adesione, il complesso terminale formato sul C7 di membrana da solo non induce l'aumento della secrezione della IL-8. Inoltre, come era stato

dimostrato precedentemente [16], l'iTCC stimola le EC a secernere la IL-8, in misura paragonabile a quella ottenuta con un noto stimolo proinfiammatorio come il TNF- α . Però se le cellule vengono prima incubate con il C5b6, il C8 ed il C9 portando alla formazione del mTCC, e poi si aggiunge l'iTCC, le cellule non rispondono allo stimolo.

Poiché il C7 di membrana sembra agire da “decoy acceptor” per gli altri componenti terminali e blocca la risposta cellulare allo stimolo proinfiammatorio indotto dall'iTCC, ci siamo chiesti se anche un'altra fase della flogosi in cui è coinvolto il TCC, l'aumento della permeabilità [72] fosse inibita in seguito alla formazione del mTCC. Per questa valutazione le HUVEC sono state fatte crescere fino alla confluenza sulla faccia superiore dell'inserito del Transwell. Alla camera superiore è stata aggiunta la BSA-FITC e la fluorescenza della camera inferiore è stata misurata dopo 7 minuti per accertare la perfetta formazione del monolayer. I pozzetti in cui l'endotelio non ha permesso il passaggio della BSA vengono usati per testare gli stimoli. Per la formazione del mTCC il C5b6, il C8 ed il C9 vengono aggiunti alle cellule e in alcuni pozzetti e dopo 2 ore viene aggiunto il TCC. La fluorescenza presente nella camera inferiore viene quantificata dopo 30 minuti mediante il Fluostar.

Come ci si aspettava, il TCC (SC5b-9) ha indotto un significativo aumento della permeabilità (Fig.18), mentre il complesso formato sul C7 di membrana sia da solo che dato prima del complesso solubile, non induce alcun aumento, dimostrando ulteriormente che il C7 garantisce una protezione alle EC nei confronti dello stimolo proinfiammatorio dato dal complesso solubile.

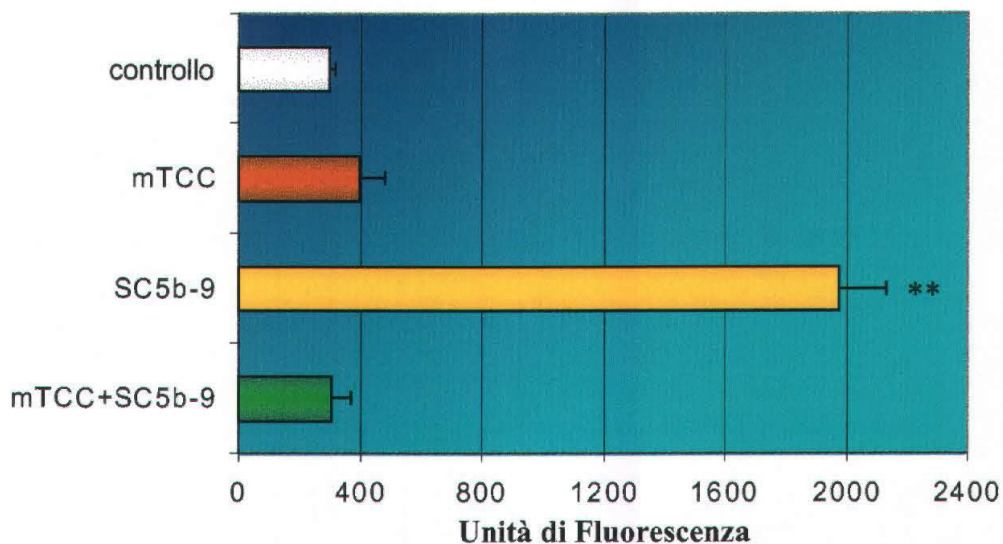


Figura 18. Valutazione della permeabilità endoteliale. Le HUVEC sono state coltivate fino alla confluenza sulla faccia superiore dell'inserto del Transwell. Il complesso terminale è stato assemblato sul C7 di membrana (2 μ g C5b6 per 10 min.+ 1 μ g C8 e 2 μ g C9 per 2 ore) e successivamente è stato aggiunto il complesso terminale del complemento citotolicamente inattivo (SC5b-9) (0,5 μ g/ml). La quantità di BSA-FITC, aggiunta nella camera superiore, e presente nella camera inferiore dopo 30 min. è stata valutata mediante lettura al Fluostar. **P<0.01

4.4 DISCUSSIONE

Il sistema del C è un importante costituente dell'immunità innata e garantisce protezione nei confronti degli agenti patogeni. Infatti, distrugge le cellule bersaglio ed è in grado di promuovere l'infiammazione. In certe condizioni patologiche, però, si assiste ad un'attivazione massiva del sistema, che provoca danni tissutali piuttosto che esercitare un effetto protettivo. Per tale ragione le cellule dell'organismo producono e presentano sulle loro membrane proteine appartenenti al sistema del C con funzione regolatoria. Questo è particolarmente importante per le EC, che si trovano esposte di continuo ai prodotti di attivazione del sistema e producono di conseguenza sia regolatori solubili, come il C1 inibitore [49], i fattori H [50] ed I [51], che regolatori di membrana, come il CD46 [52], il CD55 [53] ed il CD59 [54].

Ricerche condotte nel nostro laboratorio, hanno dimostrato che le HUVEC sintetizzano anche i componenti del sistema C3 e C7 [48]. Nel caso del C7 questa osservazione è di notevole interesse in quanto studi precedenti condotti da Wurznner et al. [73] avevano dimostrato che, a differenza degli altri componenti del sistema, le cellule epatiche non rappresentano la sede principale di sintesi del C7. Il fatto che tale componente venga sintetizzato e secreto principalmente dalle EC è importante in quanto l'endotelio, rivestendo una superficie estesa a diretto contatto con il sangue, rilascia la molecola direttamente nel compartimento dove deve svolgere il suo compito di difesa. Durante l'attivazione del sistema del C, il C5b6 lega il C7 ed il complesso così formato va incontro ad una modificazione conformazionale, esponendo transitoriamente siti idrofobici che facilitano l'adesione e l'inserimento del complesso nella membrana della cellula bersaglio [55]. Successivamente, in seguito al legame del C8 e del C9 al C5b-7 si assiste alla formazione di un poro transmembranario, che causa la lisi osmotica della cellula [1]. Il C7 secreto può anche offrire una sorta di protezione alle EC, in quanto i siti idrofobici esposti sul complesso C5b-7 e necessari per l'inserimento nella

membrana cellulare scompaiono molto rapidamente. Tuttavia il complesso trimolecolare mantiene la capacità di legare la proteina S, o vitronectina, formando un complesso citoliticamente inattivo iTCC o SC5b-9 [56]. Il complesso che ne deriva non è più in grado di causare la lisi della cellula, ma mantiene la capacità di legarsi alla membrana inducendo risposte di tipo proinfiammatorio [16]. Tutti i componenti terminali del complemento che danno luogo alla formazione dal complesso terminale vengono prodotti come molecole solubili, mentre i regolatori del complemento sono presenti sia come molecole solubili sia come proteine legate alla membrana.

I risultati presentati in questa seconda parte della tesi indicano che il C7, ma non il C3, è presente sulla membrana delle HUVEC, e che svolge una funzione di “decoy-acceptor” per gli altri componenti complementari, inibendo l’attività proinfiammatoria del complesso terminale citoliticamente inattivo.

La presenza dei componenti complementari C3 e C7 sulla membrana delle HUVEC si è inizialmente documentata utilizzando il metodo dell’ELISA su cellule. Abbiamo confrontato il risultato così ottenuto con quello di un test ELISA usato per valutare la presenza degli stessi componenti nel sovrinatante di coltura delle cellule appartenenti alla stessa popolazione. Mentre il sovrinatante presentava il C3 ed il C7 in quantità paragonabile, sulla membrana è risultato essere presente solamente il C7.

La presenza del C7, ma non del C3, sulla membrana delle HUVEC è stata confermata esaminando le cellule al microscopio a fluorescenza. Queste indagini hanno dimostrato che il C7 è presente con una distribuzione uniforme su tutta la superficie cellulare.

Per ottenere ulteriori informazioni sulla distribuzione della molecola a livello della membrana abbiamo utilizzato la microscopia elettronica a trasmissione, che ci ha permesso di confermare la presenza del C7 su tutta la superficie cellulare.

Probabilmente le HUVEC non sono il modello migliore per studiare l'espressione dei componenti complementari. Infatti Ueki et al. [74] hanno dimostrato che la quantità di C3 secreto dalle EC isolate dalla cute umana è circa dieci volte superiore a quella prodotta dalle HUVEC. Ci siamo allora chiesti se anche la presenza del C7 di membrana risultasse maggiore in altri distretti tissutali. Siamo andati, quindi, ad analizzare due distretti in cui le EC giocano un ruolo particolarmente importante cioè la cute e la decidua.

I risultati ottenuti dall'analisi immunohistochimica su sezioni congelate di decidua e di derma cutaneo umano, hanno evidenziato la presenza del C7 a livello dei vasi in entrambi i tessuti. Questi dati sono stati confermati con l'esame al microscopio a fluorescenza anche di cellule isolate dalla decidua (DEC) o dal derma cutaneo (ADMEC). In entrambi i tipi cellulari il C7 era distribuito in modo uniforme su tutta la membrana cellulare.

Abbiamo proseguito il nostro studio andando a confrontare, a livello molecolare, il C7 secreto dalle HUVEC con quello presente sulla membrana. Per questo il C7 presente nel sovrinatante e nel lisato cellulare è stato purificato mediante colonna cromatografia di affinità. Per identificare il C7 presente sulla membrana, le HUVEC sono state previamente biotinilate e quindi lisate. Il western blotting, sviluppato sia con gli anticorpi diretti contro il C7 sia con la sola streptavidina, ci ha confermato che sia il C7 presente sulla membrana che quello secreto nel sovrinatante presentano un peso molecolare simile e paragonabile a quello del C7 presente nel siero umano normale.

Per capire se il C7 è legato alla membrana tramite un ipotetico recettore, le EC sono state sottoposte all'"acid strip" o sono state trattate con una soluzione ad alta forza ionica, seguendo il metodo già impiegato da Kaul e Loos per dimostrare che il C1q è una proteina di membrana dei macrofagi [75]. Entrambi i trattamenti non hanno determinato una riduzione significativa della presenza del C7, a dimostrazione che tale molecola è covalentemente legata alla membrana cellulare.

La modulazione del C7 secreto dalle HUVEC in risposta al trattamento con diverse citochine ci ha spinto a studiare l'effetto degli stessi stimoli anche sul C7 presente sulla membrana. Sorprendentemente gli stimoli inducono una risposta diversa sulla proteina solubile rispetto a quella di membrana. Il TNF- α , che non influenza la secrezione del C7 solubile, induce un significativo aumento dell'espressione del C7 di membrana. L'IFN- γ provoca una notevole riduzione della sintesi del C7 solubile e, al contrario, un significativo incremento del C7 presente sulla membrana. L'unica citochina che modula le due forme del C7 allo stesso modo, cioè aumentandolo, è l'IL-1 α . Questo risultato ci fa supporre che il C7 di membrana sia una molecola che viene maggiormente espressa in seguito all'attivazione cellulare dovuta a stimoli proinfiammatori.

Era già stato precedentemente dimostrato che il C7 secreto dalle HUVEC era in grado di legare gli altri componenti complementari contribuendo alla formazione del complesso terminale in soluzione [48]. Abbiamo valutato la capacità del C7 presente sulla membrana cellulare di fungere da sito di assemblaggio del TCC sulla membrana. I risultati ottenuti, incubando le HUVEC con i componenti C5b6, C8 e C9 nel giusto rapporto molare, hanno dimostrato che il C7 di membrana conserva la capacità di legare gli altri componenti terminali fornendo il sito di ancoraggio per la formazione del TCC sulla membrana. Una ulteriore dimostrazione che il C7 di membrana contribuisce all'assemblaggio del TCC è data dal fatto che, preincubando le HUVEC con l'anticorpo anti-C7, la formazione del complesso molecolare era completamente inibita.

E' noto ormai da tempo che il TCC citotolicamente inattivo, interagendo con le EC, induce effetti proinfiammatori. L'iTCC, infatti, attiva le EC causando l'aumento dell'espressione delle molecole di adesione, quali VCAM-1, ELAM ed ICAM-1 [16]. E' stato logico chiederci se anche il complesso assemblato sul C7 di membrana (mTCC) avesse un ruolo attivo nello

stimolare una risposta proflogogena. I dati da noi raccolti mostrano chiaramente che, contrariamente alla stimolazione osservata con l'iTCC, la formazione del mTCC non provoca alcun aumento dell'espressione di VCAM-1, ELAM o ICAM-1. Abbiamo ottenuto lo stesso risultato anche aggiungendo il C7 solubile immediatamente dopo l'assemblaggio del mTCC. Un dato ancora più eclatante è stato quello ottenuto facendo formare il mTCC e stimolando successivamente le HUVEC con l'iTCC. In queste condizioni, l'iTCC non ha causato l'aumento dell'espressione delle molecole di adesione, che ci si attendeva, suggerendo l'ipotesi che il TCC assemblato sul C7 presente sulla membrana conferisce alle HUVEC una protezione contro un'eccessiva stimolazione di tipo proinfiammatorio indotta dal TCC solubile. Il C7 di membrana quindi lega gli altri componenti terminali del C, sottraendoli dall'ambiente circostante e riducendone, di conseguenza, la quantità disponibile per la formazione del TCC. Possiamo paragonare il ruolo del C7 presente sulla membrana delle EC con quello del "decoy-receptor" per l'IL-1 presente sui polimorfonucleati identificato da Calotta et al. [76]. L'attività svolta dalle due molecole è diversa in quanto il recettore silente per la IL-1 sequestra la citochina competendo con un recettore funzionale, mentre il C7 lega gli altri componenti terminali e contribuisce a formare un complesso terminale, che però inibisce l'effetto indotto da quello contenente il C7 solubile. Possiamo quindi attribuire al C7 di membrana un ruolo di accettore silente dei componenti complementari terminali attivati ("decoy-acceptor").

Un altro effetto indotto dall'iTCC sulle HUVEC è quello di indurre la produzione e secrezione di citochine proinfiammatorie, ed in particolare della IL-8. Per confermare ulteriormente il ruolo di "decoy acceptor" svolto dal C7 di membrana, abbiamo voluto esaminare la secrezione della IL-8 dalle HUVEC stimulate con l'iTCC da solo o aggiunto dopo la formazione del

mTCC. Anche in questo caso il mTCC ha inibito la risposta infiammatoria causata dall'iTCC.

Il TCC promuove quasi tutte le fasi delle flogosi, dalla migrazione dei neutrofili [43] all'aumento della permeabilità vascolare, come abbiamo dimostrato nella prima parte di questa tesi [72]. Ci siamo chiesti, allora, se il C7 presente sulla membrana delle HUVEC potesse influenzare anche quest'ultima manifestazione della flogosi. Per questo tipo di esperimenti abbiamo usato il complesso terminale solubile contenente la proteina S, che negli esperimenti condotti nella prima parte della tesi, è risultato essere perfettamente efficace. Ancora una volta il mTCC assemblato sul C7 di membrana non ha mostrato alcuna attività proinfiammatoria diretta ma, al contrario, è stato capace di inibire completamente la permeabilità indotta dal complesso terminale solubile.

5 CONCLUSIONI

Nella *prima parte* di questa tesi abbiamo dimostrato che sia l'iTCC che il complesso presente in circolo, l'SC5b-9, inducono l'aumento della permeabilità vascolare, promuovendo la flogosi. L'attività permeabilizzante svolta dal TCC è mediata dal rilascio da parte delle EC di molecole vasoattive quali PAF e BK. I risultati ottenuti utilizzando modelli "in vitro", sono stati confermati anche dal modello "in vivo" nel ratto. L'SC5b-9 induce la permeabilità vascolare provocando l'apertura delle giunzioni intercellulari. Abbiamo dimostrato, inoltre, che l'effetto vasopermeabilizzante provocato dal complesso terminale viene inibito dagli antagonisti dei recettori della BK di tipo B2 e del PAF.

Nella *seconda parte* abbiamo valutato l'espressione dei componenti del C sulla membrana delle EC. Abbiamo dimostrato che il C7 è presente sulle EC isolate da vari distretti tissutali, e che è covalentemente legato alla membrana. L'espressione del C7 è modulata da diverse citochine e la molecola, simile a quella solubile, mantiene la capacità di legare gli altri componenti terminali formando il TCC sulla membrana cellulare (mTCC). Il C7 di membrana svolge una funzione di "decoy acceptor" per il TCC nascente, ed è in grado di inibire tutte le attività proinfiammatorie del complesso solubile, quali l'espressione delle molecole di adesione, la secrezione della IL-8 e l'aumento della permeabilità vascolare.

6 BIBLIOGRAFIA

- 1 **Rother, K., Till, G. and Hänsch, G.,** *The Complement System*, II revised edition. Edn. Springer: 1998.
- 2 **Malhotra, R., Wormald, M. R., Rudd, P. M., Fischer, P. B., Dwek, R. A. and Sim, R. B.,** Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat Med* 1995. **1**: 237-243.
- 3 **Lachmann, P. J. and Thompson, R. A.,** Reactive lysis: the complement-mediated lysis of unsensitized cells. II. The characterization of activated reactor as C56 and the participation of C8 and C9. *J Exp Med* 1970. **131**: 643-657.
- 4 **Mollnes, T. E., Lea, T., Froland, S. S. and Harboe, M.,** Quantification of the terminal complement complex in human plasma by an enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies against a neoantigen of the complex. *Scand J Immunol* 1985. **22**: 197-202.
- 5 **Meri, S., Mattila, P. and Renkonen, R.,** Regulation of CD59 expression on the human endothelial cell line EA.hy 926. *Eur J Immunol* 1993. **23**: 2511-2516.
- 6 **Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A. M. and Stern, D. M.,** Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998. **91**: 3527-3561.
- 7 **Tedesco, F., Fischetti, F., Pausa, M., Dobrina, A., Sim, R. B. and Daha, M. R.,** Complement-endothelial cell interactions: pathophysiological implications. *Mol Immunol* 1999. **36**: 261-268.
- 8 **Jaffe, E.,** Biochemistry, immunology, and cell biology of endothelium. In **Colman, R., Hirsh, J., Maerder, V. and Salzman, E. (Eds.)** *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. JB Lippincott Company 1994, pp 718-744.
- 9 **Rosenberg, R. and Bauer, K.,** The heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. In **Colman, R., Hirsh, J., Maerder, V. and Salzman, E. (Eds.)** *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. JB Lippincott Company 1994, pp 837-860.
- 10 **Broze, G. J., Jr.,** Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995. **74**: 90-93.
- 11 **Nemerson, Y.,** Tissue factor and hemostasis. *Blood* 1988. **71**: 1-8.
- 12 **Sawdey, M. S. and Loskutoff, D. J.,** Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo. Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 1991. **88**: 1346-1353.

- 13 **Butcher, E. C.**, Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991. **67**: 1033-1036.
- 14 **Carlos, T. M. and Harlan, J. M.**, Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994. **84**: 2068-2101.
- 15 **Janeway, J. C. and Travers, P.**, *immunobiologia*. Piccin: 1996.
- 16 **Tedesco, F., Pausa, M., Nardon, E., Introna, M., Mantovani, A. and Dobrina, A.**, The cytolytically inactive terminal complement complex activates endothelial cells to express adhesion molecules and tissue factor procoagulant activity. *J Exp Med* 1997. **185**: 1619-1627.
- 17 **Newman, P. J.**, The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* 1997. **99**: 3-8.
- 18 **Del Maschio, A., Zanetti, A., Corada, M., Rival, Y., Ruco, L., Lampugnani, M. G. and Dejana, E.**, Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol* 1996. **135**: 497-510.
- 19 **Vaporciyan, A. A., DeLisser, H. M., Yan, H. C., Mendiguren, II, Thom, S. R., Jones, M. L., Ward, P. A. and Albelda, S. M.**, Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* 1993. **262**: 1580-1582.
- 20 **Nepomuceno, R. R., Henschen-Edman, A. H., Burgess, W. H. and Tenner, A. J.**, cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro. *Immunity* 1997. **6**: 119-129.
- 21 **Tenner, A. J.**, Membrane receptors for soluble defense collagens. *Curr Opin Immunol* 1999. **11**: 34-41.
- 22 **Stuart, G. R., Lynch, N. J., Lu, J., Geick, A., Moffatt, B. E., Sim, R. B. and Schwaeble, W. J.**, Localisation of the C1q binding site within C1q receptor/calreticulin. *FEBS Lett* 1996. **397**: 245-249.
- 23 **Peerschke, E. I., Smyth, S. S., Teng, E. I., Dalzell, M. and Ghebrehiwet, B.**, Human umbilical vein endothelial cells possess binding sites for the globular domain of C1q. *J Immunol* 1996. **157**: 4154-4158.
- 24 **Lozada, C., Levin, R. I., Huie, M., Hirschhorn, R., Naime, D., Whitlow, M., Recht, P. A., Golden, B. and Cronstein, B. N.**, Identification of C1q as the heat-labile serum cofactor required for immune complexes to stimulate endothelial expression of the adhesion molecules E-selectin and intercellular and vascular cell adhesion molecules 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995. **92**: 8378-8382.
- 25 **Guo, W. X., Ghebrehiwet, B., Weksler, B., Schweitzer, K. and Peerschke, E. I.**, Up-regulation of endothelial cell binding proteins/receptors for complement component C1q by inflammatory cytokines. *J Lab Clin Med* 1999. **133**: 541-550.
- 26 **Soares, M. P. and Bach, F. H.**, C1q receptors and endothelial cell activation. *J Lab Clin Med* 1999. **133**: 520-522.

- 27 **Joseph, K., Ghebrehiwet, B., Peerschke, E. I., Reid, K. B. and Kaplan, A. P.**, Identification of the zinc-dependent endothelial cell binding protein for high molecular weight kininogen and factor XII: identity with the receptor that binds to the globular "heads" of C1q (gC1q-R). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. **93**: 8552-8557.
- 28 **Collard, C. D., Lekowski, R., Jordan, J. E., Agah, A. and Stahl, G. L.**, Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol* 1999. **36**: 941-948.
- 29 **Saadi, S. and Platt, J. L.**, Transient perturbation of endothelial integrity induced by natural antibodies and complement. *J Exp Med* 1995. **181**: 21-31.
- 30 **Wang, C., Barbashov, S., Jack, R. M., Barrett, T., Weller, P. F. and Nicholson-Weller, A.**, Hemolytically inactive C5b67 complex: an agonist of polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1995. **85**: 2570-2578.
- 31 **Foreman, K. E., Vaporciyan, A. A., Bonish, B. K., Jones, M. L., Johnson, K. J., Glovsky, M. M., Eddy, S. M. and Ward, P. A.**, C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest* 1994. **94**: 1147-1155.
- 32 **Haviland, D. L., McCoy, R. L., Whitehead, W. T., Akama, H., Molmenti, E. P., Brown, A., Haviland, J. C., Parks, W. C., Perlmutter, D. H. and Wetsel, R. A.**, Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J Immunol* 1995. **154**: 1861-1869.
- 33 **Gasque, P., Singhrao, S. K., Neal, J. W., Gotze, O. and Morgan, B. P.**, Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am J Pathol* 1997. **150**: 31-41.
- 34 **Hattori, R., Hamilton, K. K., McEver, R. P. and Sims, P. J.**, Complement proteins C5b-9 induce secretion of high molecular weight multimers of endothelial von Willebrand factor and translocation of granule membrane protein GMP-140 to the cell surface. *J Biol Chem* 1989. **264**: 9053-9060.
- 35 **Kilgore, K. S., Shen, J. P., Miller, B. F., Ward, P. A. and Warren, J. S.**, Enhancement by the complement membrane attack complex of tumor necrosis factor-alpha-induced endothelial cell expression of E-selectin and ICAM-1. *J Immunol* 1995. **155**: 1434-1441.
- 36 **Kilgore, K. S., Flory, C. M., Miller, B. F., Evans, V. M. and Warren, J. S.**, The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells. *Am J Pathol* 1996. **149**: 953-961.

- 37 **Kilgore, K. S., Ward, P. A. and Warren, J. S.**, Neutrophil adhesion to human endothelial cells is induced by the membrane attack complex: the roles of P-selectin and platelet activating factor. *Inflammation* 1998. **22**: 583-598.
- 38 **Hindmarsh, E. J. and Marks, R. M.**, Complement activation occurs on subendothelial extracellular matrix in vitro and is initiated by retraction or removal of overlying endothelial cells. *J Immunol* 1998. **160**: 6128-6136.
- 39 **Tedesco, F., Nurnberger, W. and Perissutti, S.**, Inherited deficiencies of the terminal complement components. *Int Rev Immunol* 1993. **10**: 51-64.
- 40 **Platonov, A. E., Beloborodov, V. B. and Vershinina, I. V.**, Meningococcal disease in patients with late complement component deficiency: studies in the U.S.S.R. *Medicine (Baltimore)* 1993. **72**: 374-392.
- 41 **Greenstein, J. D., Peake, P. W. and Charlesworth, J. A.**, The kinetics and distribution of C9 and SC5b-9 in vivo: effects of complement activation. *Clin Exp Immunol* 1995. **100**: 40-46.
- 42 **Marks, R. M., Todd, R. F., 3rd and Ward, P. A.**, Rapid induction of neutrophil-endothelial adhesion by endothelial complement fixation. *Nature* 1989. **339**: 314-317.
- 43 **Dobrina, A., Pausa, M., Fischetti, F., Bulla, R., Vecile, E., Ferrero, E., Mantovani, A. and Tedesco, F.**, Cytolytically inactive terminal complement complex causes transendothelial migration of polymorphonuclear leukocytes in vitro and in vivo. *Blood* 2002. **99**: 185-192.
- 44 **Colten, H.**, Regulation of complement protein gene expression. In **Volanakis, J. and Frank, M.** (Eds.) *The complement system in health and disease*. Marcel Dekker, New York 1998, pp 217-240.
- 45 **Warren, H. B., Pantazis, P. and Davies, P. F.**, The third component of complement is transcribed and secreted by cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 1987. **129**: 9-13.
- 46 **Dauchel, H., Julen, N., Lemercier, C., Daveau, M., Ozanne, D., Fontaine, M. and Ripoché, J.**, Expression of complement alternative pathway proteins by endothelial cells. Differential regulation by interleukin 1 and glucocorticoids. *Eur J Immunol* 1990. **20**: 1669-1675.
- 47 **Johnson, E. and Hetland, G.**, Human umbilical vein endothelial cells synthesize functional C3, C5, C6, C8 and C9 in vitro. *Scand J Immunol* 1991. **33**: 667-671.
- 48 **Langeeggen, H., Pausa, M., Johnson, E., Casarsa, C. and Tedesco, F.**, The endothelium is an extrahepatic site of synthesis of the seventh component of the complement system. *Clin Exp Immunol* 2000. **121**: 69-76.

- 49 **Gulati, P., Lemercier, C., Guc, D., Lappin, D. and Whaley, K.,** Regulation of the synthesis of C1 subcomponents and C1-inhibitor. *Behring Inst Mitt* 1993: 196-203.
- 50 **Brooimans, R. A., Hiemstra, P. S., van der Ark, A. A., Sim, R. B., van Es, L. A. and Daha, M. R.,** Biosynthesis of complement factor H by human umbilical vein endothelial cells. Regulation by T cell growth factor and IFN-gamma. *J Immunol* 1989. **142**: 2024-2030.
- 51 **Julen, N., Dauchel, H., Lemercier, C., Sim, R. B., Fontaine, M. and Ripoche, J.,** In vitro biosynthesis of complement factor I by human endothelial cells. *Eur J Immunol* 1992. **22**: 213-217.
- 52 **Asch, A. S., Kinoshita, T., Jaffe, E. A. and Nussenzweig, V.,** Decay-accelerating factor is present on cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Exp Med* 1986. **163**: 221-226.
- 53 **McNearney, T., Ballard, L., Seya, T. and Atkinson, J. P.,** Membrane cofactor protein of complement is present on human fibroblast, epithelial, and endothelial cells. *J Clin Invest* 1989. **84**: 538-545.
- 54 **Hamilton, K. K., Ji, Z., Rollins, S., Stewart, B. H. and Sims, P. J.,** Regulatory control of the terminal complement proteins at the surface of human endothelial cells: neutralization of a C5b-9 inhibitor by antibody to CD59. *Blood* 1990. **76**: 2572-2577.
- 55 **DiScipio, R. G., Chakravarti, D. N., Muller-Eberhard, H. J. and Fey, G. H.,** The structure of human complement component C7 and the C5b-7 complex. *J Biol Chem* 1988. **263**: 549-560.
- 56 **Podack, E. R., Biesecker, G., Kolb, W. P. and Muller-Eberhard, H. J.,** The C5b-6 complex: reaction with C7, C8, C9. *J Immunol* 1978. **121**: 484-490.
- 57 **Schafer, H., Mathey, D., Hugo, F. and Bhakdi, S.,** Deposition of the terminal C5b-9 complement complex in infarcted areas of human myocardium. *J Immunol* 1986. **137**: 1945-1949.
- 58 **Biesecker, G., Katz, S. and Koffler, D.,** Renal localization of the membrane attack complex in systemic lupus erythematosus nephritis. *J Exp Med* 1981. **154**: 1779-1794.
- 59 **Corvetta, A., Pomponio, G., Rinaldi, N., Luchetti, M. M., Di Loreto, C. and Stramazzotti, D.,** Terminal complement complex in synovial tissue from patients affected by rheumatoid arthritis, osteoarthritis and acute joint trauma. *Clin Exp Rheumatol* 1992. **10**: 433-438.
- 60 **Itagaki, S., Akiyama, H., Saito, H. and McGeer, P. L.,** Ultrastructural localization of complement membrane attack complex (MAC)-like immunoreactivity in brains of patients with Alzheimer's disease. *Brain Res* 1994. **645**: 78-84.

- 61 **Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. and Minick, C. R.,** Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973. **52**: 2745-2756.
- 62 **Maciag, T., Cerundolo, J., Ilsley, S., Kelley, P. R. and Forand, R.,** An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979. **76**: 5674-5678.
- 63 **Thornton, S. C., Mueller, S. N. and Levine, E. M.,** Human endothelial cells: use of heparin in cloning and long-term serial cultivation. *Science* 1983. **222**: 623-625.
- 64 **Kraling, B. M., Jimenez, S. A., Sorger, T. and Maul, G. G.,** Isolation and characterization of microvascular endothelial cells from the adult human dermis and from skin biopsies of patients with systemic sclerosis. *Lab Invest* 1994. **71**: 745-754.
- 65 **Bulla, R., Villa, A., Bossi, F., Cassetti, A., Radillo, O., Spessotto, P., De Seta, F., Guaschino, S. and Tedesco, F.,** VE-cadherin is a critical molecule for trophoblast-endothelial cell interaction in decidual spiral arteries. *Exp Cell Res* 2005. **303**: 101-113.
- 66 **Grimwood, J., Bicknell, R. and Rees, M. C.,** The isolation, characterization and culture of human decidual endothelium. *Hum Reprod* 1995. **10**: 2142-2148.
- 67 **Casarsa, C., De Luigi, A., Pausa, M., De Simoni, M. G. and Tedesco, F.,** Intracerebroventricular injection of the terminal complement complex causes inflammatory reaction in the rat brain. *Eur J Immunol* 2003. **33**: 1260-1270.
- 68 **Schneider, C., Newman, R. A., Sutherland, D. R., Asser, U. and Greaves, M. F.,** A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem* 1982. **257**: 10766-10769.
- 69 **Bradford, M. M.,** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976. **72**: 248-254.
- 70 **Laemmli, U. K.,** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. **227**: 680-685.
- 71 **Haigler, H. T., Maxfield, F. R., Willingham, M. C. and Pastan, I.,** Dansylcadaverine inhibits internalization of 125I-epidermal growth factor in BALB 3T3 cells. *J Biol Chem* 1980. **255**: 1239-1241.
- 72 **Bossi, F., Fischetti, F., Pellis, V., Bulla, R., Ferrero, E., Mollnes, T. E., Regoli, D. and Tedesco, F.,** Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex. *J Immunol* 2004. **173**: 6921-6927.

-
- 73 **Wurzner, R., Joysey, V. C. and Lachmann, P. J.,** Complement component C7. Assessment of in vivo synthesis after liver transplantation reveals that hepatocytes do not synthesize the majority of human C7. *J Immunol* 1994. **152**: 4624-4629.
- 74 **Ueki, A., Sai, T., Oka, H., Tabata, M., Hosokawa, K. and Mochizuki, Y.,** Biosynthesis and secretion of the third component of complement by human endothelial cells in vitro. *Immunology* 1987. **61**: 11-14.
- 75 **Kaul, M. and Loos, M.,** Collagen-like complement component C1q is a membrane protein of human monocyte-derived macrophages that mediates endocytosis. *J Immunol* 1995. **155**: 5795-5802.
- 76 **Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J. G., Dower, S. K., Sims, J. E. and Mantovani, A.,** Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 1993. **261**: 472-475.