



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Molecolare e Applicata

Caratterizzazione del peptidoma legato a molecole HLA-I in
pazienti sclerodermici

HLA-class I peptidome analysis in SSc patients

**Tesi di Laurea Magistrale
di:**

Falzone Marina Immacolata

**Relatore
Chiar.mo Prof.**

Gabrielli Armando

Correlatore:

Svegliati Baroni Silvia

Sessione Straordinaria Febbraio 2020

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

1) INTRODUZIONE	5
1.1 Sistema NADPH ossidasi	5
1.1.1 Funzioni NADPH ossidasi	8
1.1.2 Classificazione	10
1.1.3 Gp91 ^{phox}	13
1.1.4 Ruolo NADPH ossidasi nella fibrosi	15
1.2 Sclerodermia	19
1.2.1 Patogenesi	21
1.2.2 Cellule del sistema immunitario	24
1.2.3 Epidemiologia e fattori ambientali	25
1.3 PDGF-R	26
1.3.1 Autoanticorpi contro il recettore del PDGF	28
1.4 HLA (human leukocyte antigen)	33
1.4.1 Peptidoma legato a molecole HLA-I	35
1.4.2 Modifiche post-traduzionali	37
2) SCOPO DELLA TESI	39
3) MATERIALI E METODI	41
3.1 Caratteristiche pazienti	41
3.2 Cellule	41
3.3 Separazione delle IgG	42
3.4 Immunofluorescenza	43
3.5 Trasfezioni	43
3.6 Immunoprecipitazione	44
3.7 Elettroforesi ed Immunoblotting	45

3.8	Homology Modeling	46
3.9	Isolamento linfociti da sangue periferico	47
3.10	Docking molecolare	47
3.11	Costruzione e screening di una library peptidica	48
3.12	Isolamento delle molecole HLA-I da cellule mononucleate	50
3.13	Eluizione di peptidi da Dynabeads	50
3.14	Analisi LC-MS/MS in modalità MRM	51
4)	RISULTATI	54
4.1	Caratteristiche pazienti	54
4.2	La subunità gp91 ^{phox} della NADPH ossidasi interagisce direttamente con il recettore del PDGF	55
4.3	Epitope mapping del PDGF-R α umano	57
4.4	Identificazione degli epitopi immunodominanti	58
4.5	Identificazione degli spliced-peptides nell'MHC-immunopeptidoma	59
5)	DISCUSSIONE	68
6)	BIBLIOGRAFIA	73

1) INTRODUZIONE

1.1 SISTEMA NADPH ossidasi

Il sistema NADPH ossidasi è un complesso enzimatico che catalizza il trasferimento di elettroni da una molecola riducente ad una ossidante. Il sistema NADPH ossidasi viene considerato un produttore di ROS “professionale” in quanto può regolare la formazione di specie reattive dell’ossigeno, in vari tessuti o tipi cellulari, in risposta a fattori di crescita, citochine o al calcio (1).

La NADPH ossidasi è un complesso multimerico costituito da un centro redox ancorato alla membrana plasmatica che comprende le subunità $p22^{\text{phox}}$ e $gp91^{\text{phox}}$ (che eterodimerizzano formando il flavocitocromo b558), dai fattori citosolici $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$, $p40^{\text{phox}}$ e da due proteine G monomeriche Rac 1 /2 e Rap 1A.

Nelle cellule a riposo, le componenti $p47^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ e $p40^{\text{phox}}$ formano un complesso a livello citoplasmatico, mentre $p22^{\text{phox}}$ e $gp91^{\text{phox}}$ si trovano ancorate alla membrana plasmatica e in quella di vescicole secretorie o di granuli specifici.

La $gp91^{\text{phox}}$ (NOX2 nei fagociti) è una glicoproteina con un dominio idrofobico ammino-terminale seguito da sei α -eliche transmembrana. Questa porzione contiene 5 residui di istidina e quattro di essi sono coinvolti nel

legame con due gruppi eme. Il gruppo eme è in grado di subire riduzioni e re-ossidazioni e quindi funzionare come trasportatore di elettroni.

I due gruppi eme sono localizzati approssimativamente tra i due strati della membrana e, insieme, costituiscono un canale per il passaggio degli elettroni attraverso di essa, formando un centro che trasferisce elettroni dal NADPH all'ossigeno con la produzione di superossido.

La porzione carbossi-terminale della molecola forma un dominio intracitoplasmatico che contiene siti di legame per i coenzimi FAD e NADPH.

Nei fagociti di pazienti $p22^{\text{phox}}$ -deficienti, la $gp91^{\text{phox}}$ non è individuabile; ciò indica che la $p22^{\text{phox}}$ stabilizza la $gp91^{\text{phox}}$ (2).

Quando le cellule a riposo vengono esposte a diversi tipi di stimoli (chimici, fisici, infiammatori, cambiamento delle condizioni cellulari), la componente $p47^{\text{phox}}$ citosolica viene fosforilata a livello dei residui di serina da parte della chinasi C (3) e, assieme alle componenti citoplasmatiche, migra sulla membrana dove si ha l'associazione al citocromo b558 e l'assemblaggio dell'ossidasi attiva (4).

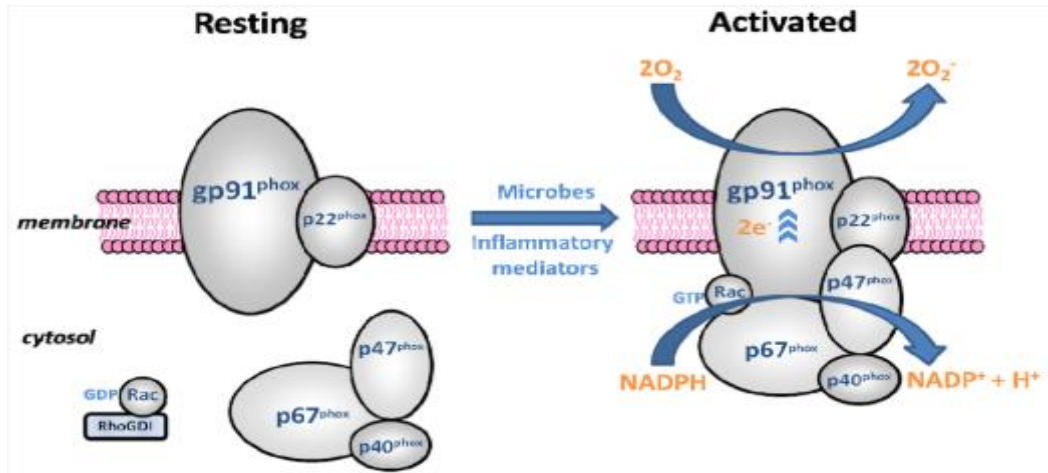


Figura 1: Sarah K., Et al; “NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives”.

Per l’attivazione è necessaria la partecipazione di Rac2 e Rap1A, due piccole GTPasi. Rac2 si trova nel citoplasma delle cellule a riposo dove forma un complesso dimerico con Rho-GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor); Rap1A è inserito nella membrana vicino al citocromo.

Durante l’attivazione, Rac2 lega il GTP e migra verso la membrana assieme al core citoplasmatico. Contemporaneamente le membrane delle vescicole secretorie e dei granuli specifici si fondono con la membrana cellulare permettendone l’inserimento del citocromo b558 e Rap1A. (4) FIGURA 1

1.1.1 Funzioni NADPH ossidasi

La NADPH ossidasi attiva catalizza la produzione di superossido attraverso la riduzione dell'ossigeno in presenza di NADPH.



Ha un ruolo fondamentale nell'immunità innata; infatti, mutazioni o delezioni a carico delle proteine Phox (gp91^{phox}, gp47^{phox}, gp67^{phox}, Rac2) causano la Malattia Granulomatosa Cronica (CGD), una patologia ereditaria caratterizzata da infezioni frequenti e croniche, causate dalla compromissione dell'abilità dei neutrofili di uccidere i microorganismi (5).

Durante un'infezione, dopo che il fagocita ha fagocitato il microorganismo e lo ha confinato nel fagosoma, l'attivazione di Phox nella membrana fagosomiale determina il rilascio di elevate concentrazioni di superossido. L'ossidazione ROS-dipendente del DNA, delle proteine, dei lipidi e dei carboidrati del microorganismo e la distruzione dei centri ferro-zolfo della catena respiratoria del batterio, ad opera della superossido, uccide il microorganismo (6).

Tuttavia, un lavoro del 2002 (7) non ha confermato il ruolo diretto dei ROS nel killing microbico esercitato dai fagociti professionisti. In questo studio si afferma che il superossido prodotto dall'ossidasi dei fagociti depolarizza la membrana del fagosoma che determina l'instaurarsi di un flusso

compensatorio di ioni H^+ e K^+ nel fagolisosoma. Ne risulta, quindi, un incremento della forza ionica che, eludendo alcune proteasi adese al proteoglicano della parete batterica, causa una digestione proteolitica e l'uccisione del microorganismo.

E' stata messa in evidenza la presenza degli enzimi NOX nelle cellule di barriera, come ad esempio nell'epitelio del colon (NOX1), nell'epitelio renale (NOX4), nei cheratinociti (NOX1) e nell'epitelio polmonare (DUOX1); ciò suggerisce il ruolo degli enzimi NOX nella difesa di questi siti, analogo a quello esercitato da NOX2 nei fagociti professionisti.

Nelle cellule dell'epitelio gastrico, a seguito dell'infezione da parte di *Helicobacter Pylori*, si ha la liberazione di ROS in maniera NOX1-dipendente e tale rilascio è correlato con l'induzione dell'apoptosi (8).

In un lavoro del 2001 (9), Arnold e colleghi hanno ipotizzato l' implicazione degli enzimi NOX nella proliferazione cellulare. In questo studio, la produzione di perossido di idrogeno NOX1-dipendente è stata correlata alla crescita tumorale, attribuendo così a NOX1 un ruolo nello sviluppo del cancro.

E' stata riscontrata un'attiva partecipazione degli enzimi NOX alla trasduzione del segnale in risposta a ormoni e fattori di crescita. Ad esempio,

NOX4 è implicato nella trasduzione del segnale angiotensina II-dipendente nelle cellule muscolari vascolari (10).

1.1.2 Classificazione

Fino ad oggi sono stati identificati sette omologhi di gp91^{phox} che si differenziano per la subunità catalitica che utilizzano (1) NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2.

- NOX1, NOX3 e NOX4, in dimensioni e struttura, sono quasi identici a gp91^{phox} o NOX2 e, come quest'ultimo, contengono centri di trasferimento elettronico impiegati durante il passaggio degli elettroni dal NADPH all'ossigeno molecolare per formare superossido.
- NOX5, costruito sulla base di gp91^{phox}, possiede all'estremità ammino-terminale un dominio Calmodulin-like che contiene quattro siti di legame per il Calcio; quando avviene il legame con il Calcio, NOX5 va incontro a un cambiamento conformazionale che determina l'esposizione di residui idrofobici i quali legano enzimi regolatori target.

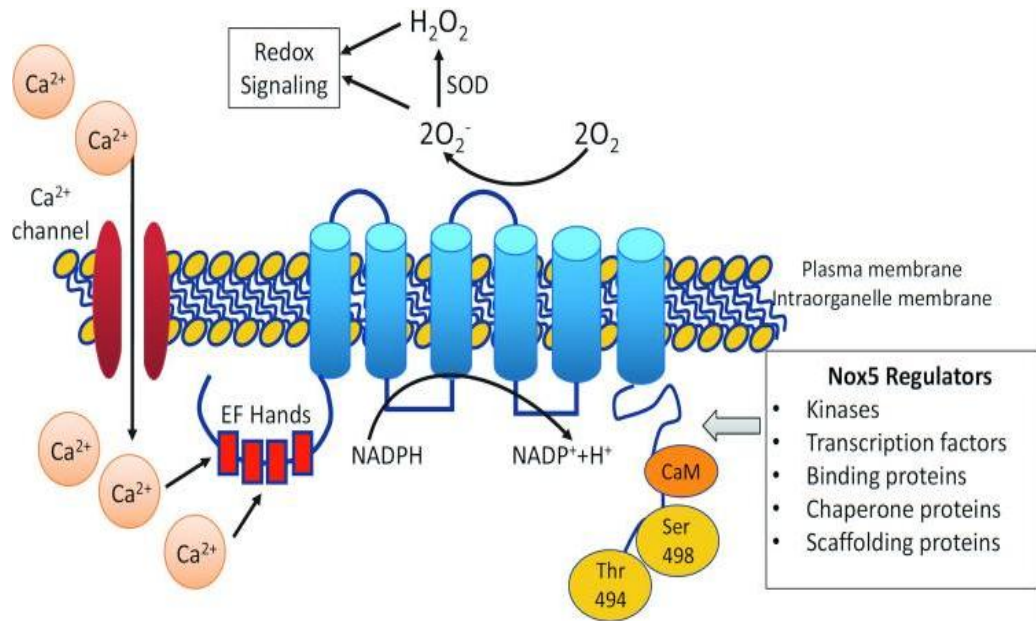


Figura 2: Diagramma che dimostra la struttura e la regolazione di Nox5. Rhian M.T., Et al; “Vascular Biology of Superoxide-Generating NADPH Oxidase 5—Implications in Hypertension and Cardiovascular Disease”. 2019

- Gli enzimi DUOX hanno una struttura analoga a NOX5 con l’aggiunta all’estremità ammino-terminale di un α -elica trans membrana alla quale è legato al di fuori della membrana cellulare un dominio omologo alla perossidasi. Sembra che gli enzimi DUOX siano designati sia alla produzione di ROS sia al loro utilizzo attraverso il dominio perossidasi (1).

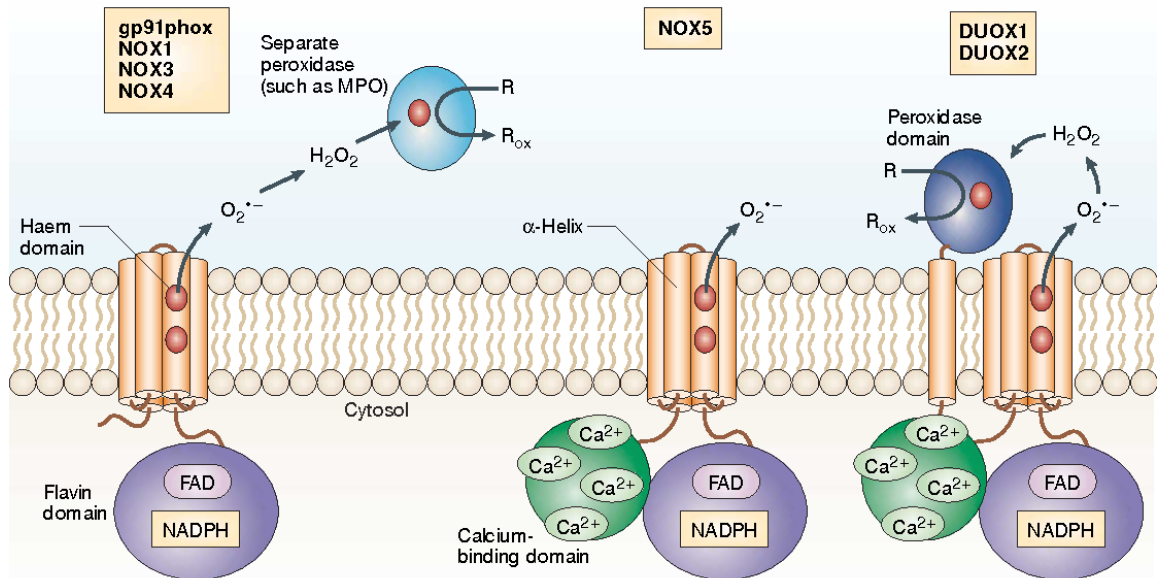


Figura 3: gp91, NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1, DUOX2; Lambeth J. D. ‘Nox enzymes and the biology of reactive oxygen’. Nature Reviews Immunology, 2004

- NOX2, inizialmente chiamato gp91^{phox}, è l'isoforma NADPH ossidasi vascolare più espressa. È espresso in cellule muscolari lisce vascolari (VSMC), fibroblasti avventiziali, cellule endoteliali e adipociti perivascolari.
- NOX4 è una proteina costituita da 578 amminoacidi ed ha il 39% di omologia con NOX2. E' espressa in maniera abbondante a livello renale, principalmente a livello dei tubuli distali (11). La peculiarità di NOX4 sta nel fatto che rilascia perossido di idrogeno anziché superossido. Questo probabilmente è dovuto alla localizzazione della NOX4 nel compartimento intracellulare dove il superossido

viene convertito in perossido di idrogeno, diffondendo, così, nello spazio extracellulare. Inoltre, a differenza della NOX2 che utilizza solo il NADPH, come substrato, è stato suggerito che NOX4 possa utilizzare il NADH oltre che al NADPH. (12).

1.1.3 GP91^{phox}

NOX2 è il componente della famiglia meglio conosciuto. Questa ossidasi è stata identificata studiando la malattia granulomatosa cronica, un'immunodeficienza ereditaria in cui i fagociti sono incapaci di produrre anione superossido e i suoi derivati portando all'insorgenza di ricorrenti infezioni batteriche e fungine (polmoniti, linfadeniti e ascessi). La causa è la produzione di una NADPH ossidasi inattiva per la presenza di difetti nelle componenti fondamentali dell'ossidasi stessa (nei due terzi dei casi il difetto è a carico della gp91^{phox}) (13). Gp91^{phox} è la subunità catalitica della NOX2 ed è fondamentale per la funzione della ossidasi (14). Si tratta di una glicoproteina che si localizza a livello della membrana plasmatica insieme alla subunità p22^{phox}, costituendo il flavocitocromo b558. La proteina presenta una regione NH 2 terminale idrofobica che forma sei segmenti transmembrana e il terzo e il quinto dominio contengono ognuno due istidine, che legano i due gruppi eme. L'estremità -COOH si affaccia nel citosol e contiene i domini

leganti il FAD e il NADPH. Gli enzimi NOX sono dei trasportatori di singoli elettroni, che vengono trasferiti dal NADPH al FAD, quindi al primo eme, poi al secondo eme e l'accettore finale è l'ossigeno. Bloccando l'estremità C-terminale viene inibita l'attività della ossidasi, ma non la traslocazione e il legame alla membrana delle sub unità citoplasmatiche (14).

L'attivazione della NOX2 si realizza attraverso una serie di interazioni tra proteine. Gp91^{phox} è associata costitutivamente a p22^{phox} e in assenza di questa subunità risulta instabile. Affinché NOX2 si attivi è necessario che le componenti citosoliche dell'ossidasi (p47, p67 e p40) e la GTPasi Rac traslochino a livello del complesso di membrana gp91^{phox}/p22^{phox}. Quando la cellula viene stimolata si ha la fosforilazione della subunità p47, che cambia conformazione e trasloca sulla membrana, dove può interagire con p22^{phox}, portando con sé le subunità p67 e p40. Il ruolo della p47^{phox} è di organizzatore, mentre p67^{phox} ha il compito di attivare il complesso enzimatico, p40^{phox} ha invece una funzione modulatoria. In seguito allo stimolo è reclutata a livello della membrana anche la GTPasi Rac e a questo punto il complesso è funzionante (15).

1.1.4 Ruolo NADPH ossidasi della fibrosi

Oltre ad essere coinvolti in patologie croniche come nefropatia diabetica, cancro e Morbo di Alzheimer (16), gli enzimi NOX rivestono un ruolo importante nella patogenesi di una grande varietà di malattie fibrotiche come ad esempio la Sclerodermia (17).

La fibrosi, reazione frequente e progressiva, che si manifesta in seguito a un danno cronico o infiammazione, è caratterizzata da un'eccessiva deposizione delle componenti della matrice extracellulare (ECM) compromettendo la funzione dell'organo interessato (18).

La fibrosi è un processo complesso che interessa vari tipi di cellule, fattori di crescita e citochine. In seguito a lesione persistente, infezione e infiammazione le cellule endoteliali secernono, , citochine in grado di reclutare ed attirare le cellule del sistema immunitario, come ad esempio neutrofili, macrofagi, linfociti T e B (19). Queste cellule infiammatorie rilasciano fattori di crescita fibrosanti quali il "Transforming Growth Factor Beta" (TGF- β), Connective Tissue Growth Factor (CTGF) e Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (19). L'azione di queste citochine ha come risultato l'attivazione e la proliferazione dei fibroblasti, e loro differenziazione in miofibroblasti (19). I miofibroblasti sono cellule avente

un'elevata capacità proliferativa, responsabile della sintesi eccessiva e dell'accumulo di ECM che contraddistingue la fibrosi.

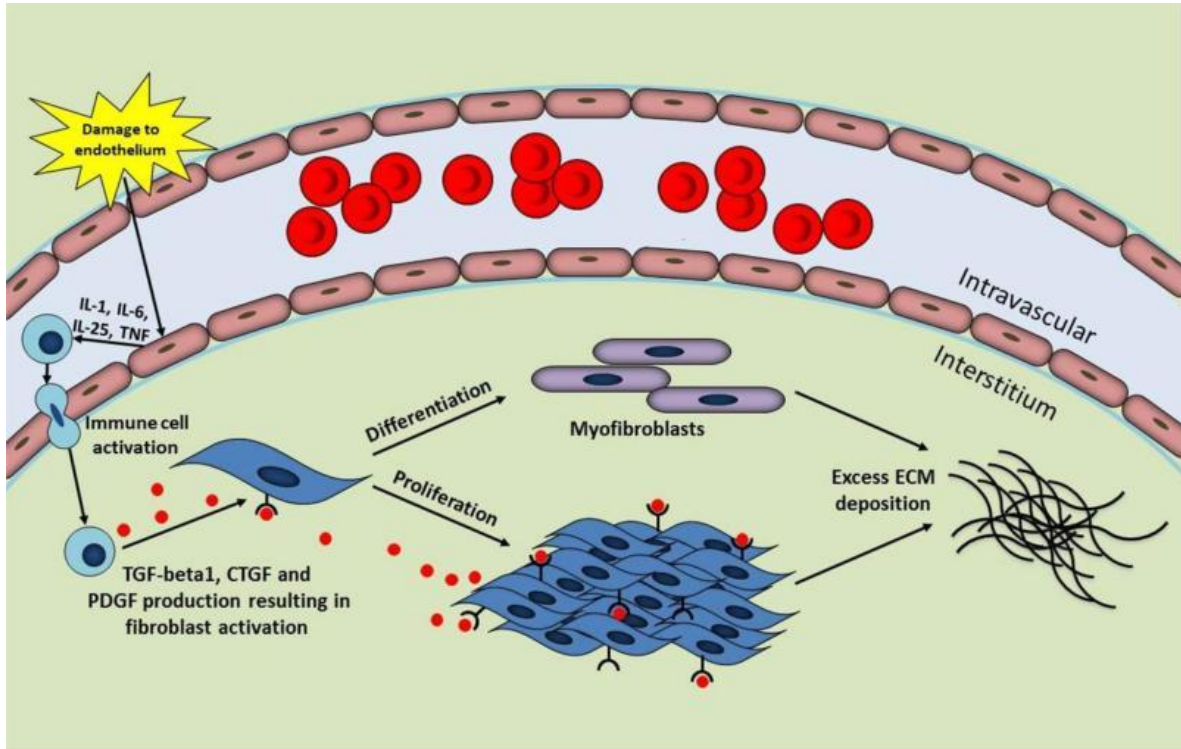


Figura 4: Fibrosi. “NADPH Oxidase Enzymes in Skin Fibrosis: Molecular Targets and Therapeutic Agents”. Babalola O., Et al, 2013.

Osservazioni recenti hanno evidenziato il coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nella patogenesi della fibrosi (20). I ROS, principalmente sono prodotti dai fagociti professionisti come meccanismo di difesa contro i patogeni. Tuttavia, in un contesto di lesione cronica, infezione o infiammazione, la generazione dei ROS diventa patologica e promuove processi profibrotici chiave come:

- Danno vascolare;

- Produzione di fattori di crescita profibrotici (TGF- β , CTGF, PDGF);
- Attivazione dei fibroblasti;
- Differenziamento dei fibroblasti attivati in mio fibroblasti con conseguente sintesi smisurata di proteine della ECM.

La caratterizzazione dell'attività degli enzimi NOX potrebbe fornire un nuovo punto di vista per lo studio dei meccanismi molecolari della fibrosi della cute. I ROS prodotti dagli enzimi NOX, interferiscono con pathway di segnale intracellulari redox-sensibili, con l'attivazione di alcuni fattori di trascrizione e con la modulazione di enzimi implicati nella fibrosi (21).

NOX1, NOX2 e NOX4, principalmente connessi alla fibrosi, interagiscono con citochine profibrotiche: NOX1 e NOX2 sono indotti dal PDGF nelle malattie fibrotiche cutanee, mentre NOX4 è indotto dal TGF- β per mediare effetti fibrotici (18). Gli enzimi NOX regolano sintesi e degradazione della ECM, ma anche la sopravvivenza dei fibroblasti. Gli enzimi NOX sono implicati nella sintesi dell'abbondante ECM, attivando indirettamente chinasi specifiche (JNK, MAPK, JACK, ERK) (22). Di conseguenza è promossa la fosforilazione proteica e i fattori di trascrizione sono indotti; l'effetto a valle è l'incremento dell'espressione di geni fibrotici codificanti per TGF- β , CTGF, PDGF (18). Gli effetti sul fenotipo associati alla fibrosi cutanea si manifestano come induzione dei miofibroblasti e conseguente abnorme

deposizione di ECM. Gli enzimi NOX possono anche promuovere la sopravvivenza dei fibroblasti mediante inibizione transiente delle caspasi, proteine coinvolte nell'apoptosi in maniera transiente attraverso l'inattivazione irreversibile del loro sito attivo.

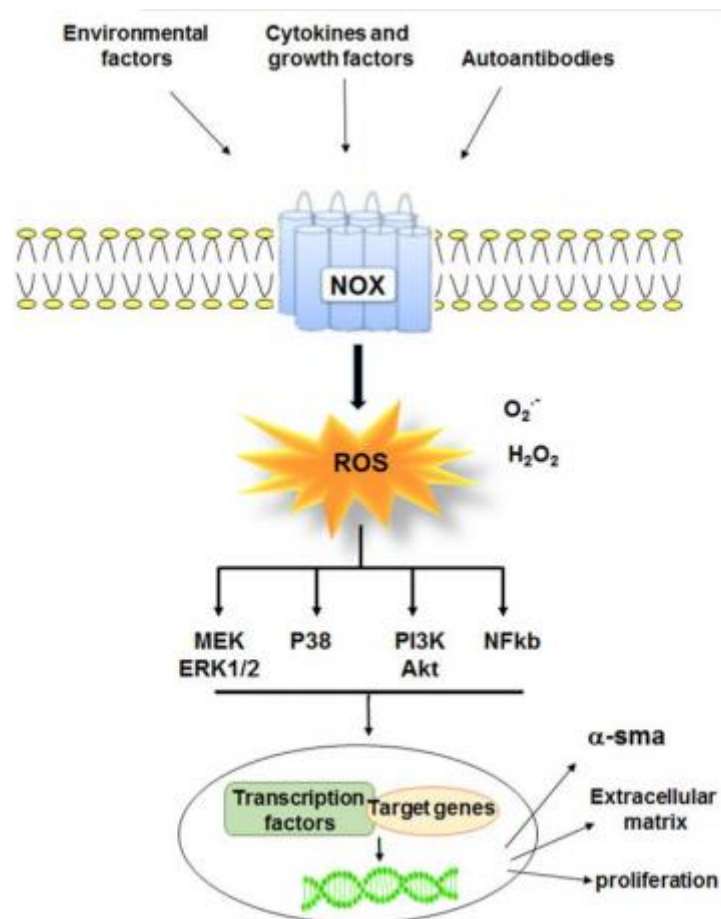


Figura 5: Sclerosi sistemica, sclerodermia, radicali liberi, stress ossidativo, NOX. Spadoni T., Et al. Free Radic Biol Med. 2018

Queste osservazioni mettono in risalto l'importanza degli enzimi NOX nella patogenesi delle malattie infiammatorie e fibrosanti e, potenzialmente, potrebbero condurre allo sviluppo di terapie anti-fibrotiche basate su l'utilizzo

di inibitori selettivi della NADPH ossidasi. Oltre che nella fibrosi cutanea, gli enzimi NOX sono implicati anche nella fibrosi a carico di molti altri organi. Ad esempio ci sono prove che documentano un coinvolgimento degli enzimi NOX nel cuore: TGF- β , stimolando NOX4 a generare ROS, causa sia l'aumento dell'espressione di proteine della ECM (collagene e fibronectina) e di CTGF sia il differenziamento dei fibroblasti in mio fibroblasti (23).

Le potenzialità terapeutiche basate sull'inibizione degli enzimi NOX per limitare la fibrosi cutanea sono presi in considerazione dalle industrie farmaceutiche. I complessi meccanismi di attivazione forniscono molte opportunità per bersagliare questi enzimi. Inibendo il trasferimento delle subunità citoplasmatiche verso la membrana cellulare, si può ridurre l'attivazione degli enzimi NOX. Babalola e colleghi (24) hanno ipotizzato un'altra strategia fondata sulla prevenzione dell'interazione di P47^{phox} con altre subunità. Un'altra possibilità si basa sull'inibizione competitiva degli enzimi NOX con molecole che simulano la NADPH ossidasi.

1.2 Sclerodermia

La Sclerodermia o Sclerosi Sistemica è una malattia cronica del tessuto connettivo, ad eziologia sconosciuta, caratterizzata da estesa fibrosi della

pelle e degli organi viscerali, alterazioni vascolari (piccole arterie e capillari periferici e viscerali) e autoanticorpi contro vari antigeni cellulari.

Si possono distinguere in due forme in base alle evidenze cliniche: la variante cutanea diffusa e quella cutanea limitata.

Nella forma cutanea limitata, la fibrosi interessa le mani, le braccia, il volto, ed è accompagnata spesso da ipertensione polmonare. Nel 90% dei casi la comparsa della fibrosi è preceduta dal fenomeno di Raynaud, Il fenomeno di Raynaud è un evento vasospastico parossistico delle arteriole delle mani e dei piedi, scatenato dal freddo, dal contatto con l'acqua, dalle vibrazioni o da particolari stati emotivi.. E' presente nel 95% dei pazienti affetti da sclerosi sistemica, spesso come sintomo di esordio della malattia (detto in tal caso fenomeno di Raynaud secondario cioè determinato dalla concomitante connettivite), associato spesso al riscontro nel siero di autoanticorpi specifici per la patologia sclerodermica e all'esame di capillaroscopia periungueale alterazioni del microcircolo.

La sua manifestazione clinica è trifasica, caratterizzata dal cambiamento di colore nelle zone colpite con andamento trifasico: all'inizio si ha pallore (fase ischemica) da vasospamo, cui segue cianosi (fase asfittica) e infine rossore (fase iperemica attiva) dovuto alla successiva rivascolarizzazione. Le varie fasi sono spesso accompagnate da dolore, torpore e disestesie/parestesie. Oltre

alle dita delle mani, che rappresentano la sede più frequentemente colpita, il fenomeno può interessare altre zone generalmente esposte, come le dita dei piedi, la punta del naso e i padiglioni auricolari.

Il fenomeno di Raynaud è idiopatico oppure secondario ad altre malattie come sclerodermia, lupus eritematoso sistemico, sindrome di Sjögren, malattie ematologiche che alterano la viscosità del sangue, dermatomiosite, connettiviti in genere e fibromialgia, o iatrogeno a uso di farmaci quali betabloccanti. La positività degli autoanticorpi anticentromero caratterizza questi pazienti con una percentuale variabile tra il 50% e il 90%, a seconda delle casistiche. La forma cutanea diffusa è rapidamente progressiva e arriva ad interessare ampie aree di cute, oltre agli altri organi interni. Virtualmente qualsiasi organo può arrivare ad essere colpito, ma sono interessati soprattutto reni, polmoni, esofago e cuore. L'interessamento viscerale costituisce il principale fattore prognostico; in particolare l'interessamento polmonare costituisce la prima causa di morte.

1.2.1 Patogenesi

La patogenesi della sclerosi sistemica non è stata del tutto chiarita. Sono stati definiti due momenti patogenetici essenziali: la comparsa precoce di danno micro vascolare e la comparsa tardiva di fibrosi.

Il danno è caratterizzato da un ampliamento degli spazi intraendoteliali e da una perdita di integrità delle cellule endoteliali stesse con loro vacuolizzazione citoplasmatica. Inoltre compare un ricco infiltrato mononucleato perivascolare che si associa a lesioni microvascolari obliterative e rarefazioni dei capillari. Nonostante l'ovvia ipossia che queste alterazioni determinano, con il conseguente aumento nel plasma dei livelli di VEGF, c'è un sostanziale deficit di vascolarizzazione (25).

La fase di infiammazione vascolare viene sostituita gradualmente da fibrosi che disorganizza definitivamente l'architettura del tessuto affetto, responsabile, inoltre, dei principali sintomi della malattia. Nella cute la fibrosi comincia dal derma profondo e dallo strato superiore sottocutaneo, si accompagna alla perdita del letto microvascolare e alla perdita della struttura reticolare. La composizione della matrice accumulata varia con lo stadio della patologia in quanto nelle fasi iniziali è possibile riscontrare diversi tipi di collagene, proteoglicani e fibre elastiche, quali la fibronectina, mentre in stadi più tardivi si accumula collagene tipo I (26), componenti della matrice extracellulare (ECM). Ad orchestrare la produzione, la deposizione e rimodellamento di queste componenti sono i fibroblasti. I fibroblasti sclerodermici presentano alterazioni funzionali e strutturali che conferiscono loro un fenotipo miofibroblastico profibrotico. Ricerche più approfondite

hanno dimostrato che la sovrapproduzione di proteine della ECM è, in realtà, più evidente solo in alcuni fibroblasti. Tali osservazioni fanno supporre l'esistenza di diverse sottopopolazioni di fibroblasti che si distinguono per la loro maggiore o minore capacità di sintetizzare collagene (27). Sulla base di certe osservazioni, sembra giustificato ritenere che l'accumulo della matrice nel tessuto sclerodermico dipenda da una attivazione dei fibroblasti e dalla selezione di una sottopopolazione fibroblastica ad alta capacità sintetica. Si ipotizza che il fenotipo sclerodermico possa essere indotto da mediatori solubili cellulari (IL-4, IL-6, TGF- β , PDGF, Endotelina-1) rilasciati o da linfociti T e macrofagi o da cellule endoteliali. Inoltre, è noto che gli stessi fibroblasti sclerodermici (fbs SSc) sono in grado di sintetizzare e rilasciare citochine come TGF- β , IL-6, IL-1 α ; citochine che, mediante meccanismo autocrino (tipo feed-back positivo), stimolerebbero i fibroblasti stessi inducendo la sintesi e la deposizione di collagene extracellulare.

In aggiunta, i fbs SSc contengono un eccesso di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Non si è ancora concordi sull'origine dei fibroblasti attivati nella cute e negli organi interni di pazienti sclerodermici. I fibroblasti potrebbero subire un'attivazione locale; in alternativa potrebbero originare o da periciti residenti o da cellule staminali mesenchimali o da cellule progenitrici (ad esempio i fibrociti) reclutati alla circolazione (28).

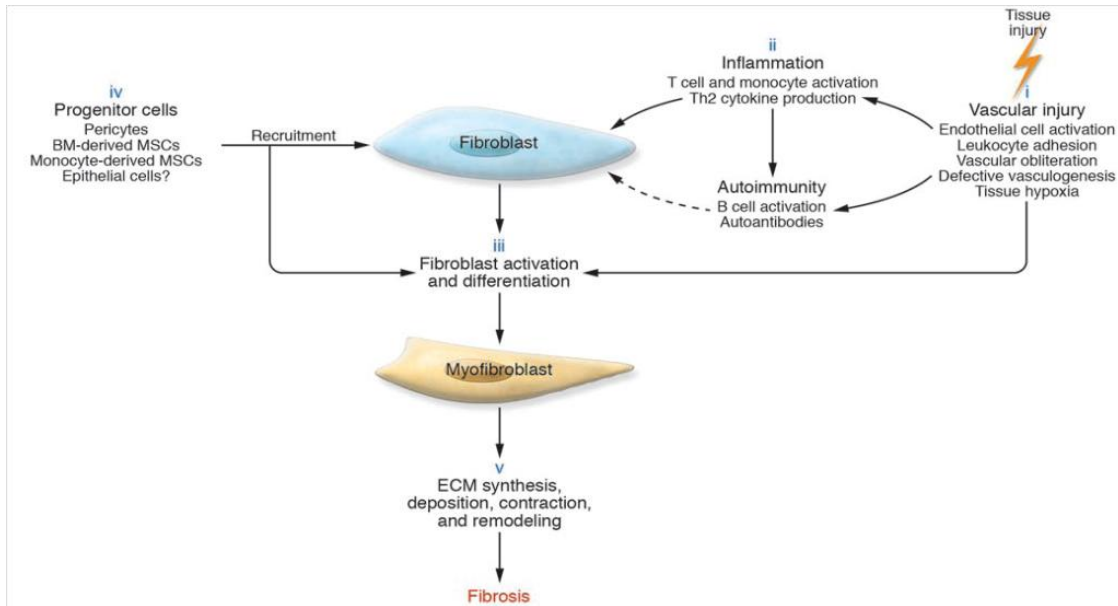


Figura 6: Patogenesi Ssc. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. John Varga Et al.

1.2.2 Cellule del sistema immunitario

L'intervento delle alterazioni immunitarie durante la sclerodermia viene suggerito dal riscontro di infiltrati linfomonocitari nella cute e a livello perivascolare e dalla presenza nel siero di anticorpi diretti contro costituenti o della parete vascolare.

Linfociti T (principalmente CD4+), monociti, mastcellule sono stati riscontrati in numero elevato in pazienti sclerodermici, suggerendo un loro coinvolgimento nello sviluppo della malattia (29). Tra le evidenze sperimentali che indicano l'intervento dei monociti nella patogenesi della SSc, va ricordato che Sampo e colleghi (30) hanno dimostrato che monociti circolanti di pazienti sclerodermici, al contrario dei polimorfo nucleati,

producono in vitro, in assenza di stimoli, quantità elevate di radicali liberi dell'ossigeno contribuendo così all'elevato stress ossidativo osservato in questi pazienti. Innumerevoli, ma altrettanto vani, sono stati gli sforzi degli studiosi per stabilire quale cellula del sistema immunitario sia in grado di dirigere la fibrosi. Inoltre, per quanto riguarda l'immunità umorale, la SSc si accompagna alla presenza di autoanticorpi che, però, non contribuiscono al danno tissutale.

1.2.3 Epidemiologia e fattori ambientali

La sclerodermia è una malattia rara con prevalenza di 50-300 casi per milione di persone ogni anno. Le donne adulte sono più colpite rispetto agli uomini con un rapporto 3-4:1 a seconda delle casistiche. La malattia insorge generalmente intorno ai 40-50 anni di età. Alcuni pazienti hanno forme cliniche di overlap e presentano in associazione alla sclerodermia manifestazioni tipiche di LES, artrite reumatoide, polio miosite o sindrome di Sjogren.

Molti dati supportano la tesi che la sclerodermia non sia una malattia chiaramente definita, ma una sindrome comprendente vari fenotipi. Alcuni stimoli ambientali quali virus, farmaci, silice possono in effetti determinare fenotipi clinici che sono simili o identici agli sclerodermici (31).

La sclerodermia presenta caratteristiche cliniche, sierologiche ed istopatologiche in comune con la malattia del trapianto verso l'ospite. Inoltre, le cellule allogenetiche sono state ritrovate sia in circolo sia nelle biopsie cutanee dei pazienti con sclerodermia.

1.3 PDGF-R

Il PDGF-R è un recettore tirosin-chinasico, il cui ligando è il PDGF (platelet-derived growth factor). Il recettore è composto da un dominio extracellulare (formato da cinque domini immunoglobulino-simili) che lega il ligando, un dominio transmembrana e un dominio citoplasmatico con attività tirosin-chinasica (32). Poiché il PDGF funziona sotto forma di dimero e può essere costituito da catene polipeptidiche A o B, quando le isoforme del PDGF agiscono sulle cellule bersaglio attivano due recettori contemporaneamente. Esistono due isoforme del recettore, α e β . Il recettore α lega le catene A e B, mentre il recettore β solo catene B con alta affinità, perciò il PDGF-AA induce omodimeri recettoriali $\alpha\alpha$, il PDGF-AB attiva recettori $\alpha\alpha$ o $\alpha\beta$, mentre il PDGF-BB può legare le tre diverse combinazioni $\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ o $\beta\beta$. Le IgGSSc sono in grado di legare il PDGF-R nelle tre diverse forme ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ o $\beta\beta$).

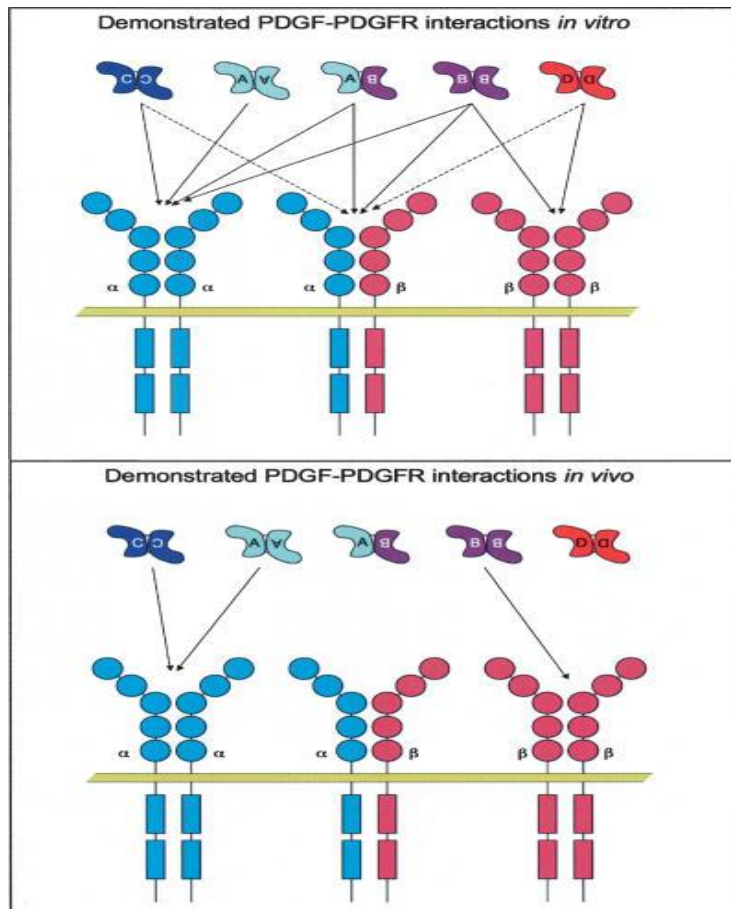


Figura 7: Interazioni PDGF – PDGFR. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. Johanna A. Et al, 2008.

PDGF svolge un ruolo centrale in diversi fenotipi e interagisce con percorsi multipli che regolano le risposte di cellule e tessuti. La tirosina chinasi del recettore, come il PDGF-R, viene attivata dal legame di ligandi specifici al dominio proteico extracellulare promuovendo la dimerizzazione e la fosforilazione delle molecole del recettore su vari residui di tirosina citoplasmatica. L'autofosforilazione di entrambi gli alfa e beta PDGF-R è accompagnata da cambiamenti conformazionali, aumento dell'attività tirosina

chinasi intrinseca e legame di varie proteine effettrici a valle che contengono domini SH2. Uno degli eventi più frequenti e importanti indotti dal PDGF è la stimolazione della produzione di ROS nelle cellule bersaglio. NOX2 è stato trovato essenziale per l'induzione di ROS dopo stimolazione con PDGF. L'attivazione del PDGF-R e la produzione di ROS dipendente dalla NADPH ossidasi potrebbe avvenire a livello di domini di membrana ricchi di lipidi (33), formando un sito localizzato per la trasduzione del segnale. L'esistenza di queste piattaforme di segnalazione della zattera lipidica con aggregazione di diverse molecole di segnalazione può rappresentare uno dei meccanismi importanti che determinano la varietà della segnalazione transmembrana. Tuttavia, il meccanismo fine mediante il quale NOX è stato attivato dopo interazioni con il recettore di membrana o le proteine di segnalazione associate è in gran parte sconosciuto.

1.3.1 Autoanticorpi contro il recettore del PDGF

Fino a qualche anno fa si riteneva che i soli anticorpi a possedere un'azione stimolatoria verso uno specifico recettore fossero quelli del morbo di Graves-Basedow, i quali agiscono legandosi al recettore del TSH e ne determinano la stimolazione. Recenti studi hanno però dimostrato l'esistenza in natura di altri gruppi di autoanticorpi con potenzialità attivatorie in altre malattie quali la

preclampsia (34) e la Sclerodermia (35). Nel siero dei pazienti sclerodermici, ma non in quello di soggetti con fenomeno di Raynaud primitivo, LES, AR, fibrosi polmonare idiopatica, né di controlli sani, sono stati identificati autoanticorpi diretti contro il recettore del PDGF (PDGF-R). Questi autoanticorpi sono presenti anche in pazienti con Graft Versus Host Disease cronica (GVHD), reazione immunitaria esercitata dall'organo del donatore nei confronti del tessuto dell'ospite durante il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, che si presenta con manifestazioni a livello cutaneo che ricordano quelle della Sclerosi Sistemica (36). In un lavoro condotto da Moroncini e colleghi (37), è stata messa in evidenza l'esistenza di vari tipi di anticorpi anti PDGF-R α : alcuni, condivisi dai pazienti affetti da sclerodermia e dai soggetti sani, non hanno effetti patologici sulle cellule coinvolte nello sviluppo della malattia; altri anticorpi, identificabili solo nei pazienti sclerodermici, determinano invece l'attivazione dei fibroblasti e la eccessiva produzione di collagene che contribuiscono alla fibrosi tipica della malattia.

Si tratta di anticorpi di classe G che riconoscono tutte le isoforme del recettore del PDGF nella sua conformazione nativa e lo attivano inducendo la fosforilazione dei suoi residui tirosinici. Le IgGSSc determinano la produzione di ROS attraverso il sistema della NADPH ossidasi ed attivano il circuito HaRas-ERK1/2-ROS. Il continuo stato di attivazione di questo

circuito, che si mantiene autonomamente, causa l' accumulo di ROS in sede intracellulare (35). Gli elevati livelli di radicali liberi dell' ossigeno indotti da questi autoanticorpi sono i responsabili, nei fibroblasti normali, dell' insorgenza del fenotipo sclerodermico, caratterizzato dall' aumentata espressione del gene per il collagene di tipo I e di quello dell' α -smooth muscle actin (α -SMA), proteina distintiva dei miofibroblasti.

Le IgGSSc attivano il PDGF-R α , replicando l' attivit  del ligando naturale PDGF, ma con una cinetica diversa. Gli anticorpi generano uno stimolo prolungato nel tempo, in quanto rimangono pi  a lungo a livello della membrana stabilizzando il complesso.

In conclusione, i dati finora ottenuti suggeriscono che gli autoanticorpi ad azione agonista diretti contro il PDGF-R α rappresentano un marcatore specifico di SSc e che l' attivit  biologica esercitata sui fibroblasti pu  avere un ruolo cruciale nella patogenesi della malattia. Gli anticorpi anti PDGF-R α si candidano ad essere pertanto un importante meccanismo patogenetico della SSc ed uno strumento chiave per una diagnosi precoce e per il monitoraggio del grado di attivit  della malattia.

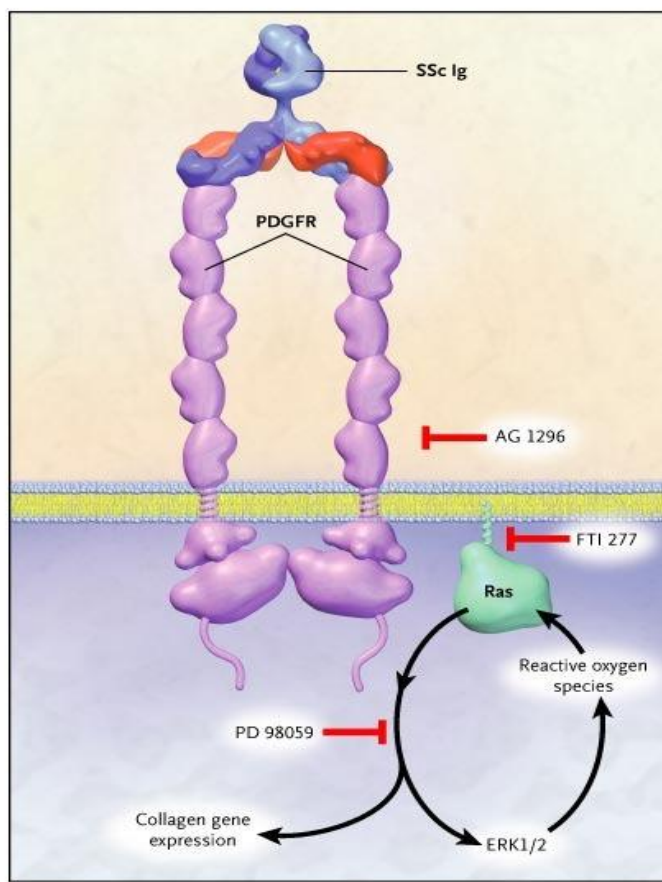


Figura 8: Diagramma schematico di una possibile cascata innescata da autoanticorpi sclerodermici contro PDGFR. (Svegliati B. S. N Engl J Med 2006).

E' stato quindi investigato il repertorio immunitario di un paziente SSc ed isolato cloni reattivi verso il PDGF-R α dai quali sono stati generati in vitro i corrispondenti anticorpi monoclonali ricombinanti specifici per il PDGF-R α . Sono stati ottenuti quattro differenti anticorpi monoclonali che differiscono solo nelle catene leggere ma che hanno caratteristiche funzionali e di legame diverse che vanno da legami con il recettore del PDGF a bassa affinità e nessuna attività agonistica a legami ad alta affinità con attivazione del

signalling intracellulare ROS-ERK-HaRas ed aumento della trascrizione dei geni del collagene in vitro (37). Utilizzando un'ampia library peptidica conformazionale del PDGF-R α sono stati in grado di identificare l'epitopo del PDGF-R α riconosciuto dall'anticorpo non agonista (una sequenza lineare di amminoacidi nella prima regione extracellulare del dominio del PDGF-R α) e un epitopo conformazionale dell'anticorpo agonista (una sequenza discontinua che comprende 3 distinte sequenze nel secondo e terzo dominio extracellulare del PDGF-R α). Mediante l'utilizzo di un saggio ELISA sono stati identificati anticorpi anti PDGF-R α in 66 su 70 pazienti SSc (94,3%), e su 63 di 120 controlli normali (48,5%), in 11 su di 26 pazienti con fenomeno di Raynaud idiopatico. Inoltre la preincubazione dei sieri dei pazienti SSc con peptidi inibitori degli anticorpi agonisti determina una inibizione del legame al PDGF-R α del 70% confronto dell'11% di quella dei controlli sani. Questi risultati dimostrano che autoanticorpi anti PDGFR α non agonisti possono essere presenti anche in soggetti con fenomeno di Raynaud o controlli sani, quelli agonisti con scleroderma-specifici e riconoscono uno specifico peptide conformazionale che permette di discriminare quelli agonisti da tutti gli altri anticorpi (37).

1.4 HLA (human leukocyte antigen)

Il sistema antigenico dei leucociti umani (human leukocyte antigen, HLA) (il complesso maggiore d'istocompatibilità dell'uomo) è una parte importante del sistema immunitario ed è codificato dai geni che sono localizzati sul cromosoma 6. Esso codifica per le molecole della superficie cellulare specializzate nel presentare i peptidi antigenici al recettore delle cellule T.

Le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità che presentano l'antigene (Ag) sono suddivise in 2 classi principali:

- Le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I
- Le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II

Le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I sono presenti come glicoproteine transmembrana localizzate sulla superficie di tutte le cellule nucleate. Le molecole di classe I sono formate da una catena pesante alfa legata a una molecola di β 2-microglobulina. La catena pesante consiste in 2 domini deputati al legame del peptide, un dominio Ig-simile, e una regione transmembrana con una coda citoplasmatica. La catena pesante della molecola di classe I viene codificata da geni situati nei loci HLA-A, HLA-B e HLA-C. Le cellule T che esprimono molecole CD8 interagiscono con le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I.

Le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II di solito sono presenti soltanto sulle cellule presentanti l'Ag professionali (le cellule B, i macrofagi, le cellule dendritiche, le cellule di Langerhans), sull'epitelio timico e sulle cellule T attivate. Le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II sono caratterizzate da 2 catene polipeptidiche (α e β); ciascuna catena presenta un dominio deputato al legame con il peptide, un dominio Ig-simile, e una regione transmembrana con una coda citoplasmatica. Entrambe le catene polipeptidiche sono codificate da geni nelle regioni HLA-DP, -DQ o -DR del cromosoma 6. Le cellule T attivate ristrette per le molecole di classe II esprimono il CD4 e sono spesso cellule helper.

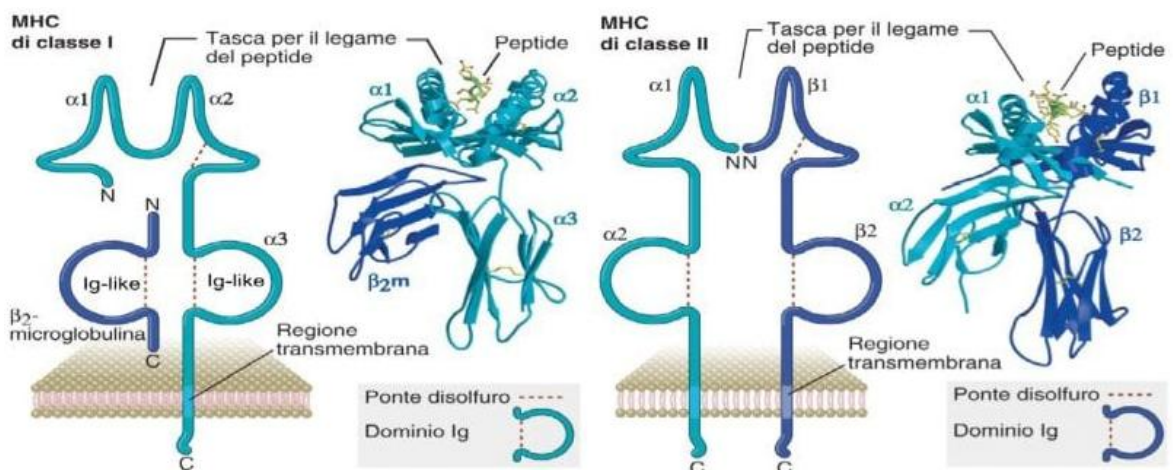


Figura 9: Abul K. Abbas, ottava edizione, Immunologia cellulare e molecolare, pagina 125-126

1.4.1 Peptidoma legato a molecole HLA-I

Il peptidoma legato a molecole HLA di classe I (HLA-I), ovvero gli epitopi assegnati alle molecole di HLA-I, agiscono sul CD8+ delle cellule T determinando una risposta immunitaria (38).

Il pool di epitopi generati dal peptidoma rappresentano anche un insieme unico di antigeni, che possiedono particolari e caratteristiche distintive. I peptidi si legano alle molecole di HLA all'interno di un solco legante l'antigene, formato dalla struttura terziaria di queste molecole. Questo solco è rivestito da aminoacidi che conferiscono una serie di vincoli sulla sequenza peptidica che può legarsi a un particolare allotipo HLA. Immunopeptidomica si riferisce all'analisi e alla caratterizzazione dei ligandi peptidici legati a HLA e molecole correlate. La metodologia contemporanea impiegata per identificare i peptidi comprende la lisi delle cellule o dei tessuti seguita dalla purificazione dell'immunoaffinità dell'HLA di scelta. La miscela di HLA e peptidi viene separata mediante cromatografia in fase inversa e analizzata mediante cromatografia liquida-tandem spettrometria di massa (LC-MS / MS) (39).

Negli studi condotti da Warren e colleghi (40) e Berkers CR e colleghi (41), è stato scoperto che il proteasoma catalizza il legame, in regioni prossimali o

distali, dello stesso antigene attraverso una reazione di transpeptidazione tra termini peptidici invece di idrolisi e rilascio di frammenti di peptidi.

Il principale problema per l'identificazione completa dei peptidi legati è la complessità del processo bioinformatico necessario, ovvero l'assenza di sequenze di peptidi legati all'interno di qualsiasi proteoma di riferimento o trascrittoma preclude l'uso della proteomica convenzionale. Per superare parzialmente questo problema, Liepe e colleghi (42) hanno generato un algoritmo "SpliceMet" (43) che genera un database teorico contenente peptidi prossimali (<25 amminoacidi) cis-legati (cioè derivati dallo stesso antigene) per ogni dato campione. Utilizzando l'algoritmo NetHLA, hanno scoperto che i punteggi di previsione sono chiaramente inferiori per i peptidi legati rispetto a quelli lineari. Tuttavia, hanno suggerito che questa differenza è dovuta al fatto che NetHLA è specifico per peptidi lineari. Nonostante questi recenti e intensi progressi nella nostra comprensione del legame del peptide HLA-I, ci sono ancora diverse domande senza risposta. Mentre alcuni studi dimostrano che il legame non è processo casuale (44) le regole (se presenti) che governano il legame non sono ancora state ben definite.

1.4.2 Modifiche post-traduzionali

Le PTM (Post-translational modifications) possono regolare processi chiave all'interno delle nostre cellule modificando biochimicamente residui amminioacidici con conseguente alterazione della struttura, posizione o funzione delle proteine (39). Le modifiche post-traduzionali (PTM) regolano la stabilità e le funzioni delle proteine e sono note varie modifiche con conseguente visualizzazione di peptidi modificati alle molecole MHC di classe I o II. Sebbene alcune PTM derivano da meccanismi costitutivamente attivi, altri sono regolati, o alterati, da infiammazione, trasformazione cellulare, morte e invecchiamento (45). Queste proteine modificate, insieme alle loro controparti native, vengono presentate tramite molecole HLA. Le alterazioni chimiche di questi peptidi PTM hanno la capacità di alterare il riconoscimento del sistema immunitario e di suscitare nuove specificità immunitarie (39). La scoperta di queste PTM è avvenuta mediante spettrometria di massa e alcune delle modifiche post-traduzionali che possono verificarsi sono rappresentate da fosforilazione, metilazione, citrullinazione e glicosilazione (39). Queste PTM creano nuove possibilità per i neoantigeni da presentare e nuove opportunità per lo sviluppo di terapie contro agenti patogeni, cellule trasformate e malattie autoimmuni (45). Nel lavoro condotto da Dzhambazov B. e colleghi (46), è stato dimostrato che un epitopo

immunodominante derivato dal collagene di tipo II nella cartilagine articolare normale è O-glicosilato, mentre l'epitopo derivato da collagene associato all'artrite spesso manca questa modifica, dando origine a un distinto neo-epitopo associato alla malattia. Cambiamenti nella presentazione di epitopi contenenti le PTM possono verificarsi anche durante la trasformazione. Una varietà di adenocarcinomi umani esprimono una forma modificata della MUC1 (human mucin-type protein) altamente glicosilata le quali catene laterali dei carboidrati sono terminate prematuramente (47). Inoltre, le vie di segnalazione e regolazione del ciclo cellulare che coinvolgono la fosforilazione sono spesso disregolate in corso di neoplasia e invecchiamento (45). Zarling e colleghi hanno recentemente dimostrato che i peptidi fosforilati presentati dalle molecole MHC di classe I variano a seconda delle cellule tumorali e che alcuni di questi fosfopeptidi possono essere specificamente riconosciuti dalle cellule T (48). L'identificazione di queste modifiche potrà essere vantaggioso in corso di monitoraggio e cura delle malattie; l'immunoterapia basata su PTM specifiche del cancro può consentire la distruzione del tumore con meno danni collaterali al tessuto normale.

2) SCOPO DELLA TESI

È ormai noto da tempo che lo stress ossidativo riveste un ruolo importante nello sviluppo della sclerosi sistemica, disordine generalizzato del tessuto connettivo caratterizzato dalla deposizione abnorme di collagene che conduce ad una progressiva sostituzione fibrotica del tessuto colpito sia al livello della cute che degli organi interni.

Nonostante gli innumerevoli studi condotti, l'eziopatogenesi della sclerodermia non è ancora pienamente chiarita, impedendone la diagnosi precoce e un'efficace terapia.

Il nostro gruppo ha già dimostrato che i fibroblasti isolati dalla cute dei pazienti sclerodermici producono alti livelli di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e che nel siero di questi pazienti vi sono anticorpi in grado di legare ed attivare il recettore del PDGF, facendo acquisire ai fibroblasti di controllo un fenotipo simil-sclerodermico.

Gli anticorpi anti-PDGFR si candidano ad essere pertanto un importante meccanismo patogenetico della SSc ed uno strumento chiave per una diagnosi precoce e per il monitoraggio del grado di attività della malattia.

Pertanto, lo scopo di questo lavoro è stato:

1. definire le regioni del PDGFR umano coinvolte nell'innescamento dei circuiti di segnale intracellulari responsabili del fenotipo sclerodermico dei fibroblasti in corso di malattia,
2. l'eventuale coinvolgimento di altre strutture di membrana ed identificazione degli epitopi funzionali,
3. indagare la possibilità che questi peptidi possano svolgere un importante ruolo nell'immunità.

3) MATERIALI E METODI:

3.1 Caratteristiche pazienti

Lo studio è stato effettuato su campioni di siero prelevato da 25 soggetti affetti da sclerodermia e 25 soggetti sani.

3.2 Cellule

Le biopsie cutanee sono state eseguite in corso di intervento di chirurgia plastica. La cute è stata separata dall'epidermide e dal grasso cutaneo, tagliata in piccoli frammenti e lasciata dissolvere in collagenasi (1 mg/ml) per 2 ore a 37°C in 5% di CO₂. Al termine dell'incubazione il prodotto della digestione enzimatica è stato lavato con PBS e centrifugato a 1200 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso nel terreno di coltura costituito da DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenente 20% di FCS, 2 mM di glutamina, penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 µg/ml). I passaggi per la subcultura sono stati effettuati mediante tripsina-EDTA, mantenuta in contatto con il monostrato di cellule per non più di 30 secondi, previo lavaggio con PBS. L'enzima proteolitico viene infine neutralizzato dall'aggiunta di terreno DMEM con 10% di siero fetale e la sospensione cellulare ottenuta da ciascuna fiasca viene divisa in due, in modo tale da permettere la

moltiplicazione delle cellule in monostrato. Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati fibroblasti dal 4° all'8° passaggio.

In alcuni esperimenti specifici sono state utilizzate linee cellulari embrionali di topo nullozigi per il recettore del PDGF (cellule F^{-/-}) e cellule F che esprimono stabilmente la subunità α del recettore del PDGF (cellule F α). Le cellule sono state coltivate e risospese nel terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenente 20% di FCS, 2 mM di glutamina, penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 μ g/ml). I passaggi per la subcoltura sono stati effettuati mediante tripsina-EDTA mantenuta in contatto con il monostrato di cellule per non più di 30 secondi, previo lavaggio con PBS. L'enzima proteolitico è infine neutralizzato dall'aggiunta di terreno DMEM con il 10% di siero fetale e la sospensione cellulare ottenuta da ciascuna fiasca è divisa in due in modo tale da permettere la moltiplicazione delle cellule in monostrato.

3.3 Separazione delle IgG

Le immunoglobuline di pazienti sclerodermici e controlli sani sono state purificate da campioni di siero, mediante ImmunoPure (A/G) IgG Purification Kit (Pierce). Inizialmente i campioni sono stati diluiti in rapporto 1:1 con

Binding Buffer e successivamente introdotti in colonne di polipropilene impaccate precedentemente con 2 ml di resina. Dopo il lavaggio della colonna con 15ml di Binding Buffer, sono stati aggiunti 5 ml di Elution Buffer, necessario per l'eluizione, e i campioni sono stati raccolti in eppendorf alla quale erano stati precedentemente aggiunti 100 μ l di Neutralization Buffer per 1 ml di campione. La successiva concentrazione è stata misurata mediante misura dell'assorbanza a 280nm.

3.4 Immunofluorescenza

Le cellule sono state fissate per 5 min in paraformaldeide (PFA) 4%, permeabilizzate con 0.2% Triton X-100 ed incubate con anticorpi specifici contro NOX2, PDGF-R α , tutta la notte a 4°C. In seguito le cellule sono state lavate con PBS e marcate con anticorpi secondari coniugati con Cy2 (verde) e Cy3 (rosso). I controlli sono stati incubati solo con gli anticorpi secondari. Le cellule sono state analizzate utilizzando un microscopio confocale Eclipse C1 (Nikon) utilizzando gli appropriati filtri fluorescenti.

3.5 Trasfezioni

Le cellule sono state piastrate in terreno di coltura senza antibiotico e dopo 24 ore trasfettate con con plasmidi che codificano per un recettore del PDGF

troncato nel residuo COOH con Lipofectamine 2000 (Invitrogen). In breve, i plasmidi full o α His (1 μ g) sono stati aggiunti a Lipofectamine 2000 diluita in terreno senza antibiotico e FCS e incubati per 20 minuti a temperatura ambiente. Nel frattempo le cellule sono state lavate in PBS e messe in terreno senza antibiotico e FCS. Il complesso è stato quindi aggiunto alle cellule e lasciato incubare a 37°C in 5% di CO₂. Dopo 4 ore è stato aggiunto terreno completo e le cellule sono state incubate per ulteriori 48 ore.

3.6 Immunoprecipitazione

Le cellule allo 0,02% di FCS in presenza o assenza di stimoli, sono state staccate con RIPA buffer (1 x PBS, 1% Nonidet P-40, 0,5% sodio deossicolato, 0,1% SDS, 0.1mg/ml PMSF, 1Mm sodio orto vanadato) e centrifugate alla velocità di 3000 rpm per 15 min a 4°C. Ad uguale concentrazione di proteine del surnatante, che rappresenta il lisato proteico totale del citosol, è stata aggiunta proteina A-agarosio e rispettivamente:

- l'anticorpo policlonale anti recettore α del PDGF alla diluizione 1:200
- l'anticorpo policlonale anti NOX2 alla diluizione 1:200
- un pool di immunoglobuline isolate da pazienti SSc (200 μ g/ml)
- un pool di immunoglobuline isolate controlli sani (200 μ g/ml)
- l'anticorpo umano SSc-Mab VH_{PAM}-Vk16F4

Ogni campione è stato incubato per 12 ore in un agitatore rotante a 4°C. L'immunoprecipitato è stato poi centrifugato a 3500 rpm per 15 min e il pellet è stato lavato per 3 volte con RIPA buffer freddo. Il campione è stato poi risospeso in Sample buffer e fatto bollire per 3 min.

3.7 Elettroforesi ed Immunoblotting

Aliquote di immunoprecipitato sono state sottoposte a SDS/PAGE in accordo con le procedure standard di separazione. Le proteine sono state trasferite dalla cella alla membrana di nitrocellulosa con l'ausilio di un Bio-Rad Trans-Blot Cell. Per assicurare che comparabili quantità di proteine fossero trasferite dal gel sulle membrane di nitrocellulosa le proteine sono state rilevate mediante colorazione con Ponceau S allo 0,05% (v/v). Le membrane di nitrocellulosa sono state incubate per 60 minuti in TBS contenente il 5% di BSA (buffer di bloccaggio) e mantenute per tutta la notte a 4°C con gli anticorpi primari alla diluizione di 1:1000 nel buffer di bloccaggio. Come anticorpi secondari sono stati utilizzati anticorpi anti-IgG, marcati con perossidasi alla diluizione 1:1000. L'espressione delle proteine è stata infine rilevata con il sistema di analisi ECL Western Blotting (Amersham) e le bande osservate ed analizzate densitometricamente mediante Chemidoc Quantità One System (Biorad).

3.8 Homology modeling

La modellazione per omologia prevede la costruzione di un modello tridimensionale rappresentante gli atomi di una macromolecola, in particolare di una proteina, essendo noti la sua sequenza amminoacidica e le strutture tridimensionali di proteine ad essa omologhe. Generalmente si considerano omologhe proteine che presentano un'identità di sequenza superiore al 25%. Proteine con un'identità di sequenza superiore al 50% produrranno una struttura ad altissima accuratezza.

Nel nostro caso la struttura tridimensionale della regione extracellulare del PDGF-R α umano, della subunità NOX2 e del frammento Fab (antigen-binding Fragment) delle IgG monoclonali ricombinanti anti PDGF-R α prodotte è stata modellata sottomettendo al *server* SWISS-MODEL le sequenze amminoacidiche ottenute, rispettivamente, consultando il *database* UniProt e grazie al sequenziamento dei geni immunoglobulinici precedentemente effettuato. In particolare utilizzando il software Swiss Pdb-Viewer abbiamo costruito i *file* progetto da sottomettere al *server*, considerando i parametri sperimentali di base e selezionando i *file* PDB 2e9wA, 2e9wB e 2ec8A come omologhi per il recettore (36,43% di identità) e 1hzh come omologo per gli anticorpi (55,21% di identità).

3.9 Isolamento linfociti da sangue periferico

Sono stati analizzati i linfociti da sangue periferico di soggetti normali (N) e con sclerosi sistemica (SSc). Inizialmente i campioni di sangue sono stati diluiti con PBS in rapporto 1:1 e stratificati su Ficol (sostanza stratificante) in rapporto 1:3 e centrifugati a 1800 rpm per 10 min a 20°C. L'anello linfocitario formatosi in seguito a centrifugazione è stato raccolto in provette da 15ml e portato a volume con PBS. Dopo centrifugazione a 1200 rpm per 10 min a 20°C il pellet è stato risospeso in 1ml di PBS e centrifugato in Minispid a 1000 rpm per 10 min. Il pellet formatosi, che rappresenta i linfociti isolati, è stato utilizzato per le successive analisi.

3.10 Docking molecolare

I file ottenuti dalla modellazione per omologia sono stati sottomessi al server ClusPro 2.0 e utilizzati per produrre una serie di modelli biostatistici in grado di predire con elevata probabilità la formazione dei diversi complessi molecolari e gli epitopi coinvolti nel legame. Il *software* DOT 1.0 è stato impiegato come programma di *docking* molecolare rigido, indicando il PDGF-R α umano come “recettore” e gli anticorpi monoclonali come “ligando” e impostando i seguenti parametri: un raggio per il *cluster* di 5Å e

un computo elettrostatico di 1.500 e 20 strutture risultanti finali. Lo scopo del docking molecolare è quello di valutare le possibili geometrie di legame di un ligando, reale o fittizio, con una molecola di cui è nota la struttura tridimensionale. Queste geometrie di legame comprendono sia il posizionamento del ligando al relativo recettore che lo stato, o gli stati, conformazionali del ligando e del recettore. In definitiva, la caratteristica essenziale di ogni simulazione dell'interazione ligando-recettore è la stima corretta dell'energia libera di legame. Nel nostro caso quindi, attraverso una serie di simulazioni *in silico* con metodi ed algoritmi di *docking* molecolare automatizzati sono state valutate le possibili geometrie di legame della citochina naturale PDGF-BB e delle IgG monoclonali umane ricombinanti prodotte al PDGF-R α , insieme agli stati conformazionali e alle energie libere di legame relative all'interazione di ciascun ligando con il recettore umano e con la subunità gp91^{phox} della NADPH ossidasi.

3.11 Costruzione e screening di una library peptidica

Grazie al servizio fornito dalla Pepscan Presto, Lelystad, Olanda, è stata generata una *library* peptidica comprendente i primi tre domini immunoglobulinici della porzione extracellulare del PDGF-R α umano e del dominio extracellulare della proteina NOX2.

Sono stati sintetizzati 80 diversi peptidi, della lunghezza di 15 amminoacidi ciascuno, parzialmente sovrapposti tra loro e fiancheggiati da residui di glicina o di cisteina. I primi sono stati mantenuti in conformazione lineare, mentre i secondi sono stati sintetizzati su *scaffold* chimici trivalenti in grado di conferire loro una conformazione *looped* (49).

Ciascuno *scaffold* chimico contiene infatti tre gruppi 1,3,5-tribromomesitylene (T3) in grado di reagire in rapporto 1:1 con i residui di cisteina presenti alle estremità dei peptidi, dando luogo alle seguenti strutture macromolecolari bicicliche:

Cys – oligomero di 15 amminoacidi – Cys – oligomero di 15 amminoacidi – Cys.
Mediante tale tecnologia (Chemically LInked Peptides on Scaffolds, Pepscan Therapeutics BV, Olanda), gli 80 peptidi lineari sono stati uniti tra loro in maniera tale da ottenere tutte le possibili combinazioni di peptidi biciclici T3-CLIPS da 30 amminoacidi ciascuno, per un totale di 6400 peptidi, così da rappresentare il numero massimo possibile di epitopi conformazionali del recettore. Il legame della citochina PDGF-BB e delle IgG monoclonali umane ricombinanti a ciascun peptide è stato quindi testato mediante uno specifico saggio PEPSCAN-based ELISA (50).

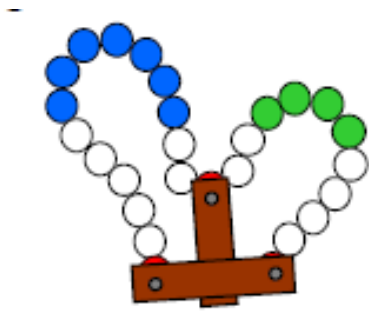


Figura 10: Ricostruzione degli epitopi conformazionali del II e III dominio del PDGF-R α umano su scaffold chimici T3-CLIPS.

3.12 Isolamento delle molecole HLA-I da cellule mononucleate

I linfociti isolati da sangue periferico di pazienti SSc e controlli sani sono stati lisati con RIPA buffer (1 x PBS, 1% Nonidet P-40, 0,5% sodio deossicolato, 0,1% SDS, 0.1mg/ml PMSF, 1Mm sodio orto vanadato) e centrifugati alla velocità di 10000 rpm per 15 min a 4°C. Ad uguale concentrazione di proteine del surnatante, che rappresenta il lisato proteico totale del citosol, sono stati aggiunti 100 μ l Dynabeads e l'anticorpo monoclonale anti HLA-ABC e incubati overnight a 4°C in agitatore rotante.

3.13 Eluizione di peptidi da dynabeads

I peptidi sono stati quindi eluiti incubando Dynabeads con 400 μ l di acido formico all'1% per 30 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione. Dopo centrifugazione a 12000 rpm per 10 minuti a 4 ° C, la soluzione contenente i

peptidi eluiti è stata recuperata e raggruppata mediante due lavaggi sub-sequenziali (400 μ l) delle microsfere di DNA utilizzando la stessa soluzione (acqua acidificata con acido formico all'1%) (frazione di eluizione). Il tampone di isolamento (PBS, 0,1% BSA, 2mM EDTA) utilizzato per mantenere i complessi peptidici MHC legati a Dynabeads è stato recuperato e analizzato da LC-MS/MS per testare l'eventuale perdita dei peptidi dai granuli (frazione di surnatante). Entrambe le frazioni sono state essiccate separatamente in un concentratore a vuoto rapido e sospese in una soluzione di acetonitrile al 2% / acido formico allo 0,1% (50 μ l). Ogni frazione, con aggiunta di una miscela pesante ad una concentrazione finale di 1000 fmol / μ l, è stata caricata su StageTip C18. Dopo la fase di desalting, i peptidi sono stati eluiti con punte C18 con 70% di ACN e 0,1% di HCOOH, essiccati e sospesi in acetonitrile al 2% / acido formico allo 0,1% per analisi LC-MS / MS. Tutte le analisi sono state eseguite in duplicato.

3.14 Analisi LC-MS/ MS in modalità MRM

Le miscele di peptidi sono state analizzate mediante analisi LC-MS / MS utilizzando un Xevo TQ-S (Waters, Milford, MA, USA) dotato di una sorgente Microflow UPLC IonKey accoppiata a un sistema di acquisizione UPLC Waters. Per ogni serie, la miscela di peptidi (1 μ L) è stata separata su un iKey BEH C18 130, 1,7 μ m, 150 μ m x 50 mm (Waters, Milford, MA,

USA) a 45 ° C con una portata di 3 µl / min. L'acido acidificato con HCOOH allo 0,1% contenente ACN al 2% è stato usato come eluente A, mentre ACN con acqua al 5% e HCOOH allo 0,1% come eluente B. I peptidi sono stati eluiti (iniziando 1 minuto dopo l'iniezione) con un gradiente lineare di eluente B in A dal 7% al 95% in 20 minuti. La colonna è stata riequilibrata alle condizioni iniziali per 4 minuti. Le analisi spettrometriche di massa sono state eseguite in modalità a ioni positivi utilizzando una finestra di rilevamento del monitoraggio di reazioni multiple (MRM) di 0,5-1,6 min per peptide; il duty cycle è stato impostato su automatico e i tempi di permanenza erano minimi di 5 ms. La tensione è stata impostata a 35 V.

Il software Skyline (3.7, versione 64-bit MacCoss Lab Software, Università di Washington, USA) è stato utilizzato per impostare ioni precursori m / z, ioni prodotto m / z e relativa energia di collisione per ciascun peptide al fine di sviluppare un metodo MRM mirato. Le migliori da due a quattro transizioni per peptide sono state selezionate tra i frammenti Y in alto. La tabella 1 riassume la sequenza di aminoacidi per tutti i peptidi monitorati e riporta le migliori transizioni, ioni precursori m / z ioni prodotto m / z, con il corrispondente valore di energia di collisione (V) per ottimizzare il metodo MRM-MS.

Tabella 1: Elenco dei parametri MRM del peptide leggero e pesante monitorati, comprese ciascuna sequenza, precursore m / z, ioni prodotto m / z ed energia di collisione (CE).

PEPTIDI	IONE PRECURSORE m/z	PRODOTTO IONI m/z	CE (V)
Light QATR	238,13++	A[y3]-347,20+	8
		T[y2]-276,17+	
Heavy Ac-QATR2345*	264,14++	A[y3]-357,21+	9
		T[y2]-286,17+	
Light QATR2345	489,28++	A[Y7]-849,50+	17
		T[Y6]-778,47+	
		R[y5]-677,42+	
		F[y4]-521,32+	
Heavy Ac-QATR2345*	514,29++ (heavy)	A[y7]-857,5195+	18
		T[y6]-786,4824+	
		R[y5]-685,4348+	
		F[y4]-529,3336+	
Light RTAQ2345	489,2856++	T[y7]-821,4628+	17
		A[y6]-720,4151+	
		Q[y5]-649,3780+	
		F[y4]-521,3194+	
Heavy Ac- RTAQ2345*	514,2980++ (heavy)	T[y7]-829,4770+	18
		A[y6]-728,4293+	
		Q[y5]-657,3922+	
		F[y4]-529,3336+	
Light 23456	339,2139++	A[y4]-530,3521+	11
		R[y3]-459,3150+	
Light 2345678	459,8034++	A[y6]-771,5312+	16
		R[y5]-700,4941+	
		K[y4]-544,3929+	

4) RISULTATI

4.1 Caratteristiche pazienti

Campioni di siero e di immunoglobuline sono stati ottenuti da controlli sani e da soggetti affetti da sclerodermia le cui caratteristiche cliniche sono riassunte nella tabella 2.

	Pazienti n=25	Forma limitata n = 17	Forma diffusa n=8
Sesso F/M (rapporto)	19/6	14/3	5/3
Età media (anni)	51.6	54.3	52.4
Durata di malattia (media in anni)	7.71	7.8	6.5
ANA (% di positività)	22 (88%)	14 (82%)	8 (100%)
Anti Scl-70	15 (60%)	10 (59%)	5 (63%)
Anti centromero (% positività)	6 (24%)	6 (35%)	0 (0%)
Coinvolgimento d'organo (n pazienti)	25	15	7

Tabella 2: Caratteristiche cliniche provenienti da controlli sani e da soggetti affetti da sclerodermia.

4.2 La subunità gp91^{phox} della NADPH ossidasi interagisce direttamente con il recettore del PDGF.

I dati conosciuti fino ad ora suggeriscono che gli anticorpi anti recettore del PDGF riconoscono sequenze specifiche del recettore al livello della membrana plasmatica e che attivano l'espressione genica del collagene attraverso la produzione di ROS NOX- dipendente.

Al fine di verificare se le strutture della NADPH ossidasi avessero un ruolo nel riconoscimento IgGSSc-PDGF-R α mediante microscopia confocale, utilizzando una doppia marcatura con anticorpi anti-gp91^{phox} e anti PDGF-R α , abbiamo analizzato la localizzazione cellulare delle due proteine. Come mostrato in Figura 11, è evidente una colocalizzazione a livello di membrana del complesso PDGF-R α /gp91^{phox}.

Anche gli esperimenti di co-immunoprecipitazione effettuati su lisato cellulare totale con anticorpo anti PDGF-R α e rivelato con anticorpi anti-gp91^{phox} confermano il dato della microscopia. La separazione elettroforetica dell'immunoprecipitato mostra (Figura 12) una banda a circa 65KD che corrisponde alla gp91^{phox} nella forma non glicosilata. Dato che, come dimostrato in precedenza, le IgGSSc mimano il PDGF e riconoscono il recettore del PDGF abbiamo testato la loro capacità nell'immunoprecipitare l' immunocomplesso PDGF-R α /gp91^{phox}. Il lisato cellulare totale

immunoprecipitato con pool di IgGSSc o con l'anticorpo monoclonale umano anti PDGF-R α (isolato in precedenza da cloni linfocitari di un paziente SSc autoreattivi nei confronti del PDGF-R α) è stato blottato contro anticorpi anti-PDGF-R α e gp91^{phox}. La Figura 12 mostra come sia le immunoglobuline patologiche che l'anticorpo monoclonale isolato in precedenza da cloni di linfociti B autoreattivi di un paziente, siano in grado di legare il complesso.

Per chiarire ulteriormente le caratteristiche del complesso PDGF-R α /gp91^{phox} del sistema della NADPH ossidasi abbiamo prodotto dei mutanti del recettore alfa del PDGF troncati nella regione COOH terminale. Questa regione è la responsabile della trasmissione del segnale dopo attivazione indotta da fattori di crescita. Cellule F^{-/-} knockdown per il recettore del PDGF sono state trasfettate transientemente con i mutanti. Dopo aver valutato l'efficienza di trasfezione il lisato cellulare totale è stato immunoprecipitato con anticorpi anti gp91^{phox} o PDGF-R α .

Come mostrato in Figura 13 il complesso PDGF-R α /gp91^{phox} è ancora stabile anche in presenza dei mutanti del recettore dimostrando quindi che la regione importante ai fini dell'interazione è localizzata nell'estremità NH. Questa parte del recettore risulta essenziale anche per il legame con le immunoglobuline SSc essendo queste ultime in grado di immunoprecipitare anche le cellule knockdown per il recettore del PDGF e trasfettate con il

mutante. La valutazione della produzione di ROS dopo stimolo con PDGF o IgGSSc mostra come il trattamento in queste cellule non sia in grado di aumentare la produzione di specie reattive dell'ossigeno in maniera efficace ad indicare che la funzionalità di queste molecole richiede l'integrità del complesso PDGF-R α /gp91^{phox}.

4.3 Epitope mapping del PDGF-R α umano

Grazie ai dati sperimentali raccolti e alle informazioni ottenute dallo studio della letteratura scientifica abbiamo ricostruito, mediante modellazione per omologia, la struttura tridimensionale della regione extracellulare del PDGF-R α umano, della subunità gp91^{phox} della NADPH ossidasi e del frammento legante l'antigene delle diverse IgG monoclonali ricombinanti prodotte. Mediante l'utilizzo di un software dedicato di ultima generazione è stata predetta la possibilità statistica di tali complessi macromolecolari di interagire tra loro e con quali epitopi.

Il docking molecolare dei complessi PDGF-R α umano-anticorpi monoclonali ricombinanti e gp91^{phox} ha prodotto una serie di modelli biostatistici (figura 14) che predicono l'interazione, con un'elevata probabilità, tra:

- il ligando naturale PDGF-BB e un epitopo compreso tra il secondo e il terzo dominio extracellulare del PDGF-R α umano, come preannunciato dalla letteratura scientifica,
- l'autoanticorpo monoclonale umano anti PDGF-R α precedentemente isolato da un soggetto SSc e un epitopo compreso tra il primo e il secondo dominio extracellulare del PDGF-R α umano,
- Un epitopo discontinuo tra il II e il III dominio extracellulare del PDGF-R α e la regione 124-169 e 222-261 di gp91^{phox}.

4.4 Identificazione degli epitopi immunodominanti

L'identificazione delle regioni del recettore del PDGF e della subunità gp91^{phox} della NADPH ossidasi specificamente coinvolte nel legame con i diversi autoanticorpi ci ha condotto alla creazione di una library peptidica conformazionale che copre i primi tre domini immunoglobulinici della porzione extracellulare del PDGF-R α umano e la regione extracellulare della subunità gp91^{phox} della NADPH ossidasi. Tale library comprendeva 120 peptidi conformazionali totali da 30 oligomeri ciascuno che ricoprivano della porzione extracellulare del PDGF-R α umano e la regione extracellulare della subunità gp91^{phox} della NADPH ossidasi.

Al fine di confermare i dati predittivi in silico con più robusti saggi di legame in vitro, su tale library peptidica sono stati testati 25 sieri SSc e 25 controlli. Da questa library abbiamo identificato due peptidi immunodominanti (uno per ciascuna delle due molecole analizzate) in grado di discriminare tra sieri SSc e sieri controllo. L'analisi statistica ha evidenziato la presenza di due coorti di pazienti SSc (reattivi e non reattivi, questi ultimi non diversi dai controlli sani) ciascuno composta da pazienti con la variante diffusa e limitata. Le correlazioni cliniche hanno messo in luce che, aldilà della corrente classificazione, i campioni dei pazienti sclerodermici reattivi contro entrambi gli epitopi immunodominanti appartenevano a soggetti con malattia attiva e in fase di progressione mentre quelli non reattivi presentavano caratteristiche patologiche meno progressive (Figura 15).

4.5 Identificazione degli spliced-peptides nell'MHC-immunopeptidoma

Al fine di valutare se nell'immunopeptidoma legato a molecole HLA-I dei pazienti SSc fossero presenti peptidi riarrangiati corrispondenti a quelli discriminanti identificati nella library, abbiamo immunoprecipitato campioni di linfociti isolati da soggetti controllo e da pazienti sclerodermici con anticorpo specifico anti HLA-I umano. L'analisi dell'immunoprecipitato è stato fatto mediante MRM usando i parametri descritti nei materiali e metodi.

Per migliorare la precisione dell'analisi la loro concentrazione è stata calcolata con il metodo di quantificazione dello standard interno. Le aree di picco dei cromatogrammi ionici estratti sono state utilizzate per definire la quantità relativa di ciascun peptide leggero dalla concentrazione nota di ciascun peptide pesante aggiunto come miscela di spiking. Nella Tabella 3 sono state riportate le concentrazioni di peptidi monitorate nell'eluizione e frazioni di surnatante da sangue periferico di controlli normali (N) e con sclerosi sistemica (SSc).

I risultati hanno mostrato chiaramente un diverso contenuto di ciascun peptide tra i pazienti sclerodermici (SSc) e soggetti normali (N) con livelli decisamente più alti per i campioni SSc. Il rapporto SSc / N varia da 7 volte per il peptide QATR fino a più di 200 volte per il peptide 23456 (Tabella 3). I supernatanti recuperati prima della fase di eluizione dei peptidi da Dynabeads non contenevano i peptidi monitorati ad eccezione del peptide 23456 (Tabella 3 e Figura 16).

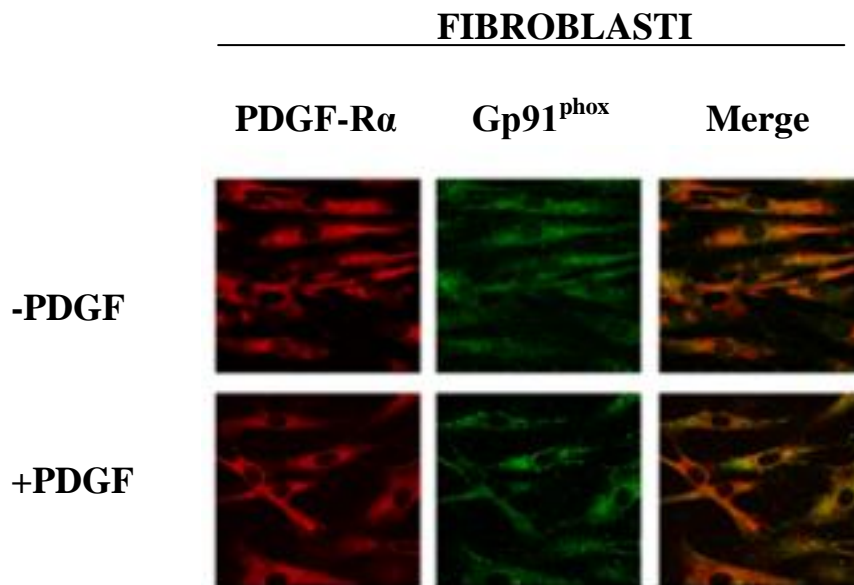


Figura 11: Colocalizzazione del PDGF-R α and Gp91^{phox} in fibroblasti umani. Fibroblasti cutanei normali sono stati messi in quiescenza, 0.2% FCS, per 24 ore. Le cellule sono state fissate su vetrino con paraformaldeide (5min) e bloccate con PBS 1% siero ed incubate con anticorpi anti- gp91^{phox} e PDGFR α . I vetrini sono stati analizzati mediante microscopia confocale.

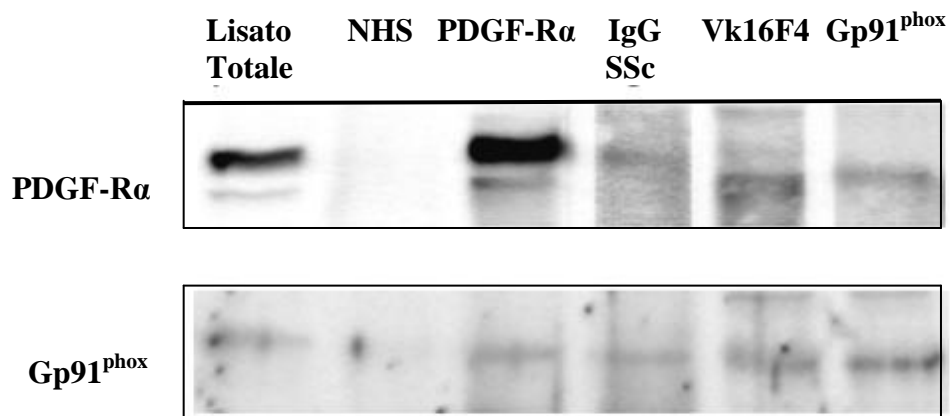


Figura 12: Interazione tra PDGF-R α e gp91^{phox}.

Fibroblasti cutanei normali sono stati messi in quiescenza, 0.2% FCS, per 24 ore, successivamente immunoprecipitati con anticorpo anti PDGF-R α e IgGSSc. I lisati cellulari sono stati separati mediante elettroforesi e blottati con anticorpi anti gp91^{phox} e PDGF-R α rispettivamente.

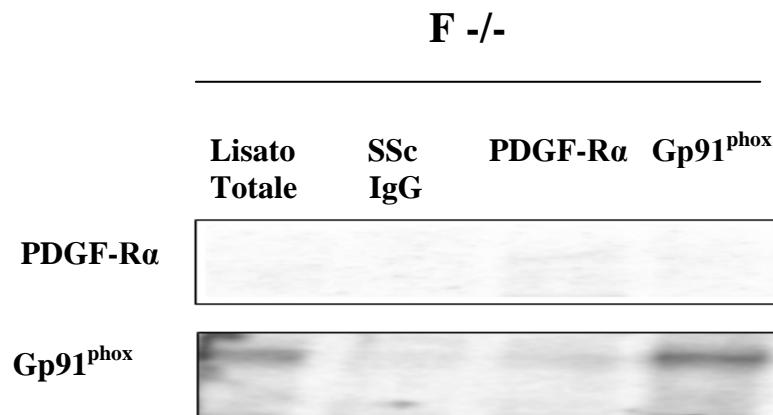
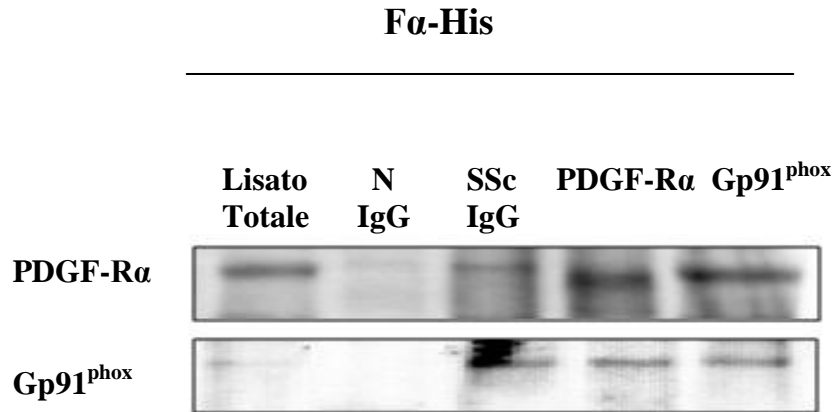


Figura 13: Trasfezioni con mutanti del PDGF-R α .

Fibroblasti embrionali di topo mancanti del PDGF-R α umano (F $^{-/-}$) sono stati trasfettati con mutante α HIS del PDGF-R α . (A) I lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con anticorpi anti-gp91^{phox} o immunoglobuline SSc. Il blot è stato effettuato con anticorpi anti-PDGF-R α e gp91^{phox}. Cellule F $^{-/-}$ trasfettate come sopra sono state stimolate con PDGF o IgG isolate da pazienti sclerodermici e normali per 15 min. ed incubati con DCHF-DA.

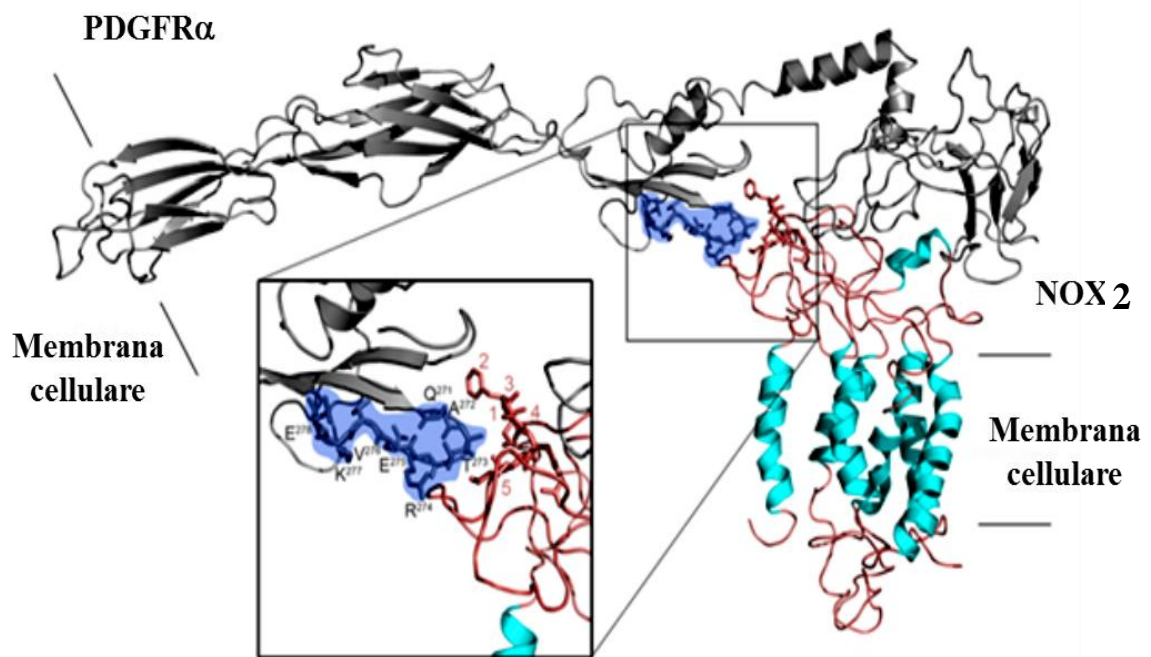


Figura 14: Rappresentazione in 3D dell'epitopo conformazionale del PDGF-R α umano e di gp91^{phox}. I peptidi immunodominanti del PDGF-R α (in blu) e NOX2 (rosa) sono evidenziati nel riquadro.

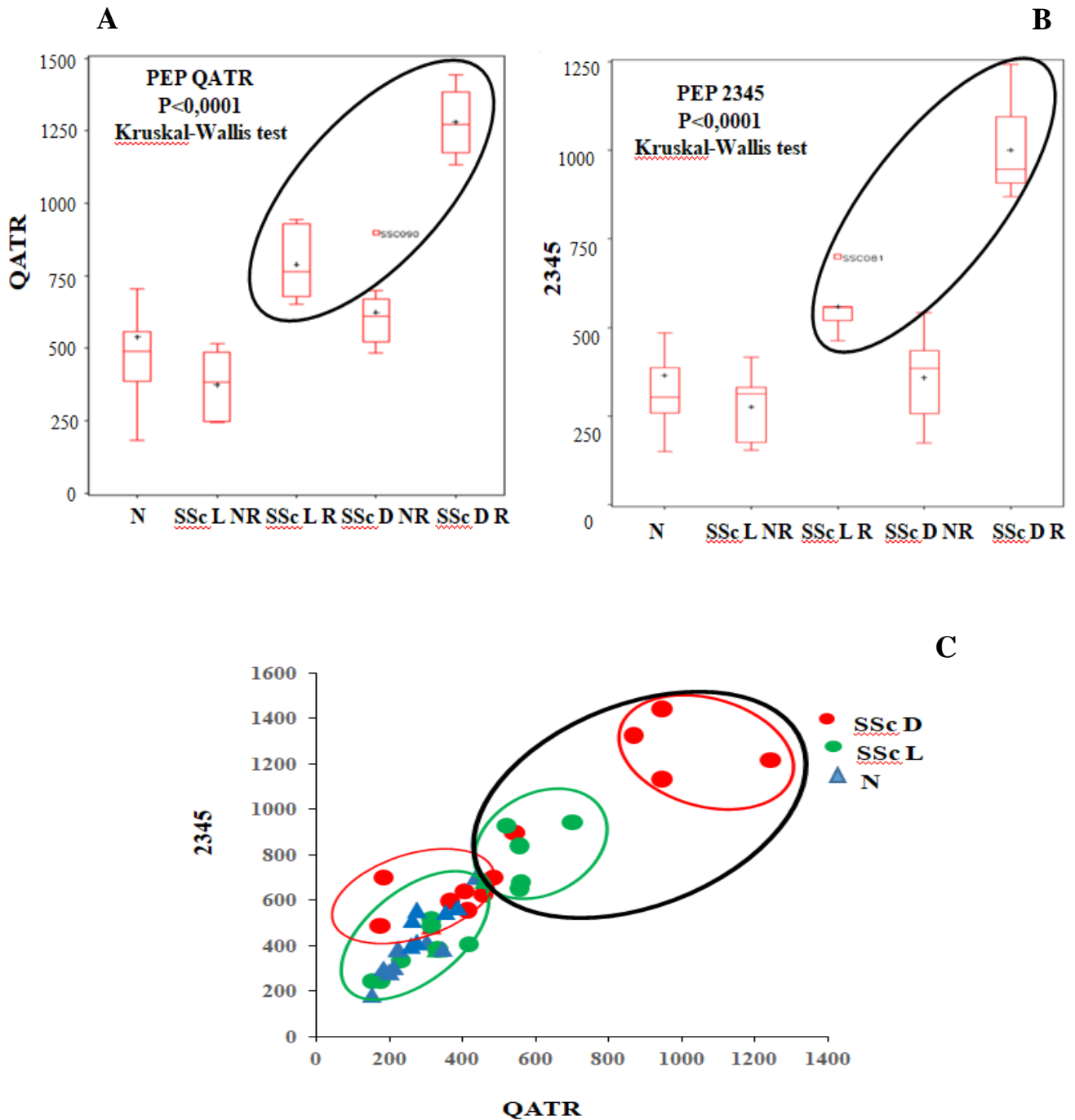


Figura 15: riconoscimento dei peptidi QATR e 2345 da parte dei sieri SSc e N su library peptidica. Box plot della reattività dei sieri di controlli (N) e di pazienti con sclerodermia limitata (L) e diffusa (D) nei confronti del peptide QATR (A) e 2345 (B). Il valore di cutoff è stato ottenuto mediante test di Kruskal-Wallis. Diagramma (C) che mostra la distribuzione della reattività dei sieri nei confronti di ciascun peptide

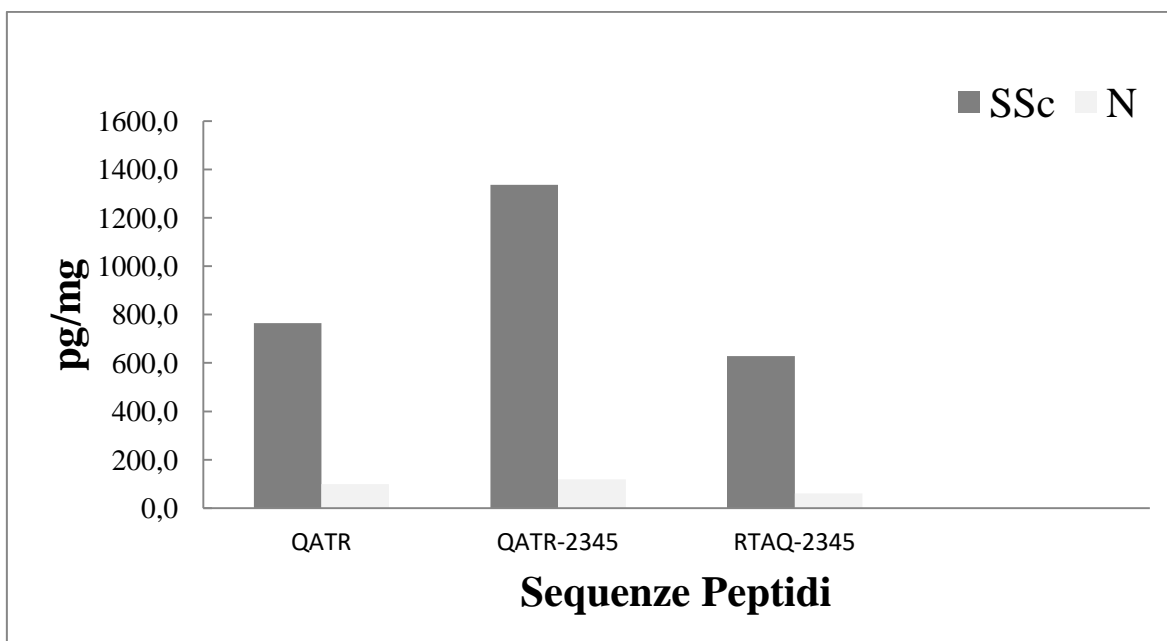
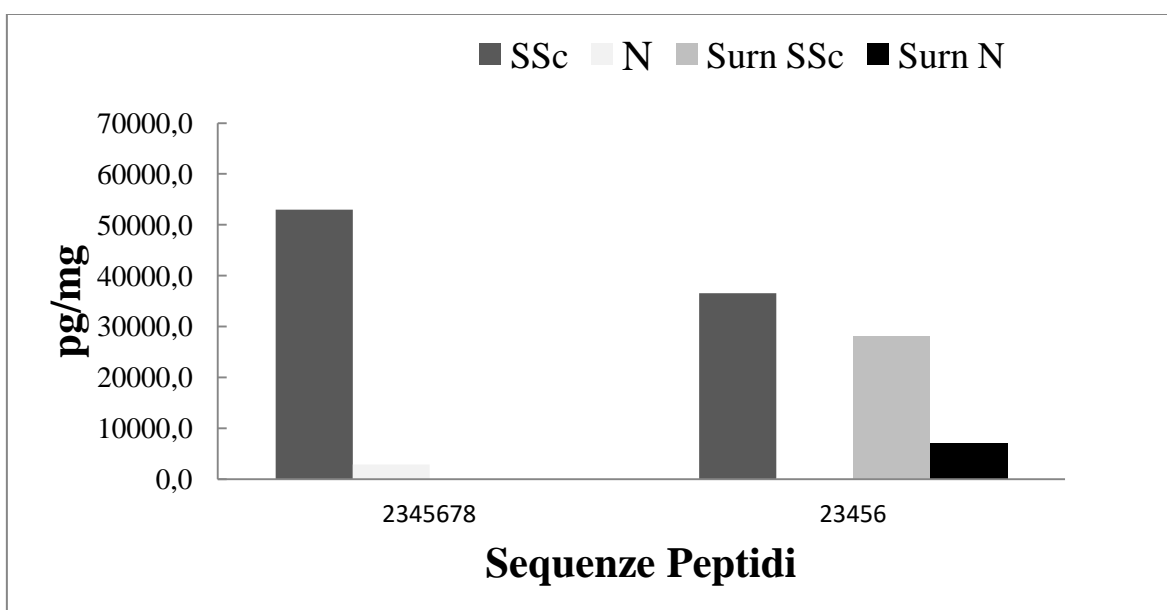
A**B**

Figura 16: Istogramma rappresentativo della quantità dei peptidi quantificati in ciascun campione rilevato sia nella frazione eluita (A) che nel surnatante (B). I supernatanti recuperati prima della fase di eluizione dei peptidi da Dynabeads non contenevano i peptidi monitorati ad eccezione del peptide 23456 (Tabella 3).

Peptidi	Frazione di eluizione pg/mg		Rapporto	Frazione supernatante pg/mg		Rapporto
	SSc	N	SSc/N	Surn SSc	Surn N	SSc/N
QATR	764,2	99,2	7,7	n.d.	n.d.	-
QATR-2345	1336,5	119,0	11,2	n.d.	n.d.	-
RTAQ-2345	628,9	60,5	10,4	n.d.	n.d.	-
2345678	53007,4	2897,0	18,3	n.d.	n.d.	-
23456	36527,6	160,3	227,9	28056,9	7114,6	3,9

Tabella 3: Concentrazione di peptidi monitorata nella frazione di eluizione e surnatante (Surn) dal sangue periferico da soggetti normali (N) e con sclerosi sistemica (SSc). I risultati hanno mostrato chiaramente un diverso contenuto di ciascun peptide tra i pazienti SSc e N con livelli decisamente più alti per i campioni SSc. Il rapporto SSc / N varia da 7 volte per il peptide QATR fino a più di 200 volte per il peptide 23456.

5) DISCUSSIONE

La sclerodermia è una patologia ad eziopatogenesi ancora poco chiara caratterizzata da ispessimento e fibrosi della cute e degli organi interni. La difficoltà di gestione di questa patologia altamente debilitante deriva dalla mancanza di strumenti efficaci per la diagnosi precoce e il monitoraggio. E' quindi urgente comprendere i meccanismi cellulari e molecolari che innescano e conducono allo sviluppo della fibrosi in corso di sclerodermia per la messa a punto di un saggio per la diagnosi precoce, un corretto monitoraggio del paziente e la formulazione di una terapia realmente efficace. Studi in vivo ed in vitro condotti dal nostro gruppo nel corso di questi anni hanno permesso di identificare nel siero di pazienti sclerodermici la presenza di anticorpi stimolatori diretti contro il recettore del PDGF (35).

Gli anticorpi anti-recettore del PDGF hanno specifiche caratteristiche biologiche: attraverso l'aumentata produzione di ROS NOX dipendente determinano nei fibroblasti normali l'insorgenza del fenotipo sclerodermico con aumentata espressione dei geni per il collagene di tipo I ed il gene per l' α -Smooth Muscle Actina (α -SMA). Il clonaggio di autoanticorpi da cellule B memoria di pazienti sclerodermici ci ha permesso di identificare diverse

sottoclassi delle quali solo alcune dotate di attività biologica e quindi correlate con lo sviluppo della malattia (37).

Alla luce di questi dati la nostra attenzione si è rivolta in particolare a definire le regioni del recettore coinvolte nell'innescamento dei circuiti di segnale intracellulari, in seguito a riconoscimento e legame a queste stesse regioni da parte di fattori fisiologici come la citochina PDGF e di fattori patogeni come gli autoanticorpi anti-recettore del PDGF ed altre eventuali molecole coinvolte nell'interazione.

I dati riportati in questa tesi mostrano come gli autoanticorpi anti PDGF-R α siano in grado di riconoscere anche la subunità gp91phox della NADPH ossidasi(23). Il recettore e NOX2 formano un complesso attivo legato fisicamente a livello della membrana cellulare. Alcune evidenze da altri sistemi suggeriscono che la formazione della NADPH ossidasi potrebbe portare alla trasformazione di micro-domini lipidici della membrana (lipid rafts) in piattaforme di signalling ossido-riduttivo che includono altre molecole e recettori in modo da specificare, amplificare e localizzare i singoli segnali del proprio compartimento subcellulare.

I dati mostrati chiariscono in parte il meccanismo attraverso il quale gli autoanticorpi esercitano i loro effetti biologici divenendo patogenetici. Essi promuovono l'espressione costitutiva del PDGF-R α sulla superficie cellulare

in associazione con il complesso della NADPH ossidasi proteggendo il recettore dal suo normale turnover e stabilizzandolo.

Gli esperimenti con i mutanti del recettore del PDGF ci hanno permesso di stabilire la localizzazione dell'interazione tra i due complessi a livello dei domini transmembrana ed extracellulari del recettore e quelli extracellulari di gp91^{phox}, proprio quelli che sembrano essere coinvolti nel legame con gli autoanticorpi. Al fine di identificare le sequenze specifiche riconosciute dagli autoanticorpi monoclonali anti PDGF-R α e quelle interessate nel legame recettore-gp91^{phox} si è proceduto alla homology modeling della struttura tridimensionale delle molecole coinvolte seguita dalla predizione del sito di legame mediante docking molecolare in silico.

I dati predetti dall'analisi in silico sono stati quindi confermati mediante il saggio di legame di sieri di pazienti SSc e controlli sani con una library di peptidi specifica per l'estremità N-terminale dei tre domini extracellulari del PDGF-R α e del dominio extracellulare di gp91^{phox}. I risultati ottenuti ci hanno permesso di :

- Identificare l'epitopo conformazionale del PDGF-R α situato tra il secondo e il terzo dominio extracellulare come quello direttamente coinvolto nel legame con l'anticorpo anti recettore.

- Identificare la sequenza del peptide situata nel dominio extracellulare di gp91^{phox} riconosciuta dagli auto anticorpi dei pazienti SSc.

Inoltre è interessante sottolineare che l'analisi statistica ha evidenziato due corti di pazienti SSc una reattiva e una non reattiva. I pazienti il cui siero è risultato positivo ad entrambi i peptidi avevano un fenotipo più grave di malattia rispetto ai pazienti SSc i cui sieri erano risultati negativi indicando che gli anticorpi monoclonali di questi soggetti riconoscono un antigene formato da entrambe le proteine.

E' ormai noto che nel corso della risposta immunitaria peptidi della lunghezza di circa 8-10 amminoacidi sono presentati sulla superficie delle cellule dalle molecole di classe I del sistema maggiore di istocompatibilità (39). Questi peptidi derivano dalla degradazione delle proteine da parte del proteosoma, generando frammenti lineari della sequenza originale. E' ormai chiaro che però dalla degradazione proteosomiale si possono originare peptidi riarrangiati (splicing peptides) provenienti cioè da proteine diverse amplificando così il potenziale repertorio antigenico (51).

La spettrometria di massa tandem (MS/MS), è diventata un ottimo metodo di scelta per l'analisi di campioni di proteine o peptidi, grazie all'elevata

sensibilità ed attendibilità dei risultati. I metodi MS/MS consentono non solo l'identificazione peptidica, ma anche il sequenziamento, la rilevazione e localizzazione di possibili modificazioni post-traduzionali. I dati della spettroscopia nell'analisi dell'immunopeptidoma legato all'HLAI dei soggetti sclerodermici mostrano la presenza di un trans-spliced peptide corrispondenti a quelli discriminanti identificati nella library. L'identificazione di questo peptide immunodominante rappresenta una novità assoluta nell'ambito delle patologie autoimmuni.

Queste scoperte potrebbero aprire nuovi scenari sulla possibilità che peptidi anticorpali possano essere prodotti anche fisiologicamente, potendo così influenzare la naturale risposta immunitaria ed facilitare la strada per la messa a punto di metodiche innovative per la diagnosi, il monitoraggio e la cura di questa patologia.

6) BIBLIOGRAFIA

- 1) **Lambeth J. D.**; “*Nox enzymes and the biology of reactive oxygen*”. *Nat. Rev. Immunol. Vol.4, 181-189, 2004.*
- 2) **Dinauer M.C., Et al**; “*Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease*”. *J. Clin. Invest., Vol. 86, 1729-1737, 1990.*
- 3) **Schröder K¹.**; “*Isoform specific functions of Nox protein-derived reactive oxygen species in the vasculature*”. *Curr. Opin. Pharmacol. Vol 10,122-126, 2010.*
- 4) **Babior B. M. ;** “*NADPH oxidase: an update*”. *Blood, Vol. 93, 1464-1476, 1999.*
- 5) **Segal A. W. :** “*The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease*”. *Mol. Med. Today, Vol. 2, 129-135, 1996.*
- 6) **Roos D. Et al**; “*Immunology: lethal weapons*”. *Science, Vol. 296, 669-671, 2002.*
- 7) **Reeves E. P. Et al**; “*Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux*”. *Nature, Vol 416, 291-297, 2002.*

8) Teshima S., Et al; “ *Regulation of growth and apoptosis of cultured guinea pig gastric mucosal cells by fitogeni oxidase 1*”. *A. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* Vol. 279, 1169-1176, 2000.

9) Arnold R. S. Et al; “*Hydrogen peroxide mediates the cells produce abundant superoxide anion through an NADPH oxidase-like system*”. *Gastroenterology*, Vol. 115, 1186-1196, 2001.

10) Wingler K. Et al; “*Upregulation of the vascular NADPH-oxidases isoforms NOX1 and NOX4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo*”. *Free Radc. Biol. Med.*, Vol. 31, 1456-1464, 2001.

11) Shiose A., Et al; “ *A novel superoxide-producing NAD(P)PH oxidase in kidney*”. *J. Biol. Chem.*, Vol. 276, 1417-1423, 2001.

12) Ago T., Et al; “ *Nox4 as the major catalitic component o fan endothelial NAD(P)H oxidase*”. *Circulation*. Vol. 109, 227-233, 2004.

13) Heyworth P.G. Et al; “*Chronic granulomatous disease*”. *Curr. Opin. Immunol.* Vol.155, 78-84, 2003.

- 14) Burritt J.B. Et al;** “*Functional epitope on human neutrophil flavocytochrome b558*”. *J. Immunol. Vol.170, 6082-6089, 2003.*
- 15) Bedard K. Et al;** “*The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*”. *Physiol. Rev.Vol. 87245-313, 2007.*
- 16) Lambeth JD;** “*Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy*”. *Free Radic. Biol. Med.Vol. 43, 332-47, 2007.*
- 17) Spadoni T., Et al;** “*NADPH oxidase, oxidative stress and fibrosis in systemic sclerosis*”. *Free Radical Biology and Medicine Vol. 125, 90-97, 2018*
- 18) Samarakoon R. Et al;** “*TGF-beta signaling in tissue fibrosis: molecular targets and therapeutic opportunities*”. *Cell. Signal., Vol 25, 264-268, 2013.*
- 19) Moinzadeh P., Et al;** “*Scleroderma*”. *In: Fitzpatrick’s Dermatology in general medicine, VIII edizione. McGraw-Hill, New York.*
- 20) Mavrikakis M. E. Et al;** “*Ascorbic acid does not improve endothelium-dependent flow mediated dilatation of the brachial artery in patients with Raynaud’s phenomenon*”

secondary to sistemi sclerosis". *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, Vol. 73, 3-7, 2007.

21) Altenhofer A. Et al; " *The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease*". *Cell. Mol. Life Sci.*, Vol, 69, 2327-2343, 2012.

22) Sampson N., Et al; " *Therapeutic targeting of redox signaling in myofibroblast differentiation and age-related fibrotic disease.*" *Oxidative Med. Cell. Longev.*, Vol.10, 1155-2012, 2012.

23) Cucoranu I., Et al; " *NADPH oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta I-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts*". *Circ. Res.*, Vol. 97, 900-907, 2005.

24) Babaola O., Et al; " *NADPH Oxidase Enzymes in Skin Fibrosis: Molecular Targets and Therapeutic Agents*

25) Fleming J. N., Et al; " *Capillary regeneration in scleroderma: stem cell therapy reverses phenotype?*". *PLoS One.*, Vol. 3, 1452, 2008.

26) Perlish J. S., Et al; " *Identification of collagene fibrils in scleroderma skin*". *J. Invest. Dermatol.*, Vol. 90, 48-54, 1988.

27) Le Roy E. C. ; “ *Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro : a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast*”. *J. Clin. Invest.*, Vol. 54, 880-889, 1974.

28) Bellini A., Et al; “*The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses*”. *Lab. Invest.*, Vol. 87, 858-870, 2007.

29) Whitfield M. L., Et al; “*Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin*”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 100, 12319-12324, 2003.

30) Sambo P., Et al; “*Monocytes of patients with systemic sclerosis (scleroderma) spontaneously release in vitro increased amounts of superoxide anion*”. *J. Invest. Dermatol.*, Vol. 112, 78-84, 1999.

31) Nietert P. J., Et al; “*Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors*”. *Curr. Opin. Rheumatology.*, Vol. 44, 318-322. 2005.

32) Yarden Y., Et al; “*Structure of the receptor for Platelet-Derived-Growth-Factor help define a family of closely related growth factor receptors*”. *Nature* Vol. 32, 323- 226, 1986.

- 33) Kalogerou A. Et al;** *“Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis”*. *Ann. Rheum. Dis. Vol. 64, 1233-1235, 2005.*
- 34) Yu X. Et al;** *“Development of cardiomyopathy and atrial tachyarrhythmias associated with activating autoantibodies to beta-adrenergic and muscarinic receptors”*. *J. Am. Soc. Hypertens. Vol.3, 133–140, 2009.*
- 35) Svegliati S. Et al;** *“Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis”*. *N. Engl. J. Med., Vol 354, 2667-2676, 2006.*
- 36) Svegliati S. Et al;** *“Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease”*. *Blood. Vol. 110, 237-241, 2007.*
- 37) Moroncini G., Et al;** *“Characterization of binding and qualification of human antibodies to PDGFR α using a biosensor-based approach”*. *Analytical Biochem., Vol 528, 26-33, 2017.*
- 38) Groettrup M. Et al;** *“Proteasomes in immune cells: more than peptide producers?”*. *Nat. Rev. Immunol. Vol. 10, 73-78, 2010.*

- 39) Ramarathinam S.H. Et al;** *Employing proteomics in the study of antigen presentation: an update2. Expert Review of Proteomics., 2018*
- 40) Warren E.H. Et al;** *“An antigen produced by splicing of noncontiguous peptides in the reverse order”. Science, Vol. 313, 1444-1447, 2006.*
- 41) Berkers C.R. Et al;** *“Transpeptidation and reverse proteolysis and their consequences for immunity”. The international journal of biochemistry & cell biology, Vol. 41, 66-71, 2009.*
- 42) Liepe J., Et al;** *“A large fraction of HLA class I ligands are proteasome-generated spliced peptides”. Science Vol. 21, 354-358, 2016.*
- 43) Platteel A.C. Et al;** *“CD8(+) T cells of Listeria monocytogenes-infected mice recognize both linear and spliced proteasome products”. Eur. J. Immunol., Vol 46, 1109-1118, 2016.*
- 44) Ebstein F. Et al;** *“Proteasomes generate spliced epitopes by two different mechanisms and as efficiently as non-spliced epitome”. Sci. Rep. Uk. Vol. 6, 2016.*

- 45) Engelhard, V. H., Et al;** *“Post-translational modifications of naturally processed MHC-binding epitopes. Current Opinion in Immunology, Vol. 18, 92–97, 2006.*
- 46) Dzhambazov B. Et al;** *“ The major T cell epitope on type II collagen is glycosylated in normal cartilage but modified by arthritis in both rats and humans”. Eur J Immunol 2005.*
- 47) Baldus S.E., Et al;** *“Biochemistry and pathological importance of mucin-associated antigens in gastrointestinal neoplasia”. Adv Cancer Res. Vol. 79, 201-248, 2000.*
- 48) Zarling A.L. Et al;** *“ Phosphorylated peptides are naturally processed and presented by major histocompatibility complex class I molecules in vivo. J. Exp. Med. Vol. 192, 1755-1762, 2000.*
- 49) Timmerman P., Et al;** *“Functional Reconstruction of Structurally Complex Epitopes using CLIPS Technology”. The Open Vaccine Journal, Vol. 2, 56-67, 2007.*
- 50) Slootstra J.W., Et al;** *“Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries”. Molecular Diversity Vol. 1, 87-96, 1996.*

51) Liepe J. Et al; *“Post-traslational peptide splicing and T cell responses”*. *T. Rend. Immunology. Vol 38, 2017.*