

**Università degli Studi del Piemonte
Orientale
"Amedeo Avogadro"**



**Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare
Anno accademico 2008/2009**

**Ricerca di anticorpi anti-OPN in pazienti affetti da
Sclerosi Multipla**

Responsabile scientifico:

Prof. Umberto Dianzani

Dottorando:

Andrea Falaguerra

Introduzione

1.1 L'AUTOIMMUNITA'

Per autoimmunità si intende un fenomeno caratterizzato da una risposta immune rivolta contro antigeni "self" cioè costituenti normali dell'organismo. Autoimmunità non è sinonimo di malattie autoimmuni anche se il fenomeno interviene sempre nella patogenesi di queste forme morbose, con un'ampia varietà di manifestazioni cliniche. □ Normalmente il sistema immunitario produce minime quantità di autoanticorpi, cioè di anticorpi rivolti contro gli antigeni self, che servono proprio per mantenere ed esaltare la capacità di discriminare tra self e non-self. Questa capacità, caratteristica e peculiare del sistema immunitario, prende il nome di tolleranza. □

Le malattie autoimmuni sono quel gruppo di patologie causate dall'alterazione del sistema immunitario, che reagisce contro i tessuti dell'organismo stesso. La modificazione dei meccanismi di riconoscimento cellulare, che normalmente permettono all'organismo di distinguere tra antigeni autologhi (self), ossia gli elementi a esso appartenenti rispetto a quelli a esso estranei (non self), determina una produzione di auto-anticorpi che possono colpire singoli organi o innescare malattie sistemiche, cioè danneggiare intere funzioni dell'individuo.

Gli antigeni che stimolano la produzione di autoanticorpi sono i più diversi, sia per struttura chimica (lipidi, proteine, acidi nucleici, cromatina, complessi macromolecolari) sia per localizzazione cellulare (membrana, citoplasma, nucleo), sia per localizzazione tissutale. □ Spesso le strutture che fungono da autoantigeni (o antigeni self) sono rappresentate da molecole dotate di importanti proprietà funzionali, quali gli enzimi; a volta le molecole autoantigeniche, prima di divenire tali, vengono modificate dal punto di vista strutturale da processi biochimici e metabolici diversi, quali quelli che si realizzano in corso di infezioni, proliferazione cellulare, morte cellulare per apoptosi.

Oggi sappiamo che i sistemi di tolleranza al *self*, che normalmente proteggono ciascun individuo dai linfociti potenzialmente autoreattivi, possono in certi casi fallire. Questi fallimenti portano allo sviluppo di una risposta inappropriata del sistema immunitario contro tessuti *self*, fenomeno detto autoimmunità.

Negli anni '60 si riteneva che tutti i linfociti autoreattivi fossero eliminati durante la maturazione linfocitaria e che le malattie autoimmuni fossero l'inevitabile conseguenza di errori nel processo di delezione delle cellule autoreattive negli organi linfatici primari.

Sucessivamente sono state ottenute numerose evidenze sperimentali in contrasto con questo modello. Infatti, linfociti autoreattivi maturi circolanti sono normalmente presenti nei soggetti sani normali.

Poiché la presenza di queste cellule non porta inevitabilmente allo sviluppo di manifestazioni autoimmuni, la loro attività deve essere regolata attraverso meccanismi tollerogenici attivi in periferia. L'alterazione di questi meccanismi può portare all'attivazione di cloni di linfociti autoreattivi e al conseguente sviluppo di reazioni umorali o cellulari contro antigeni *self*.

In molti casi i fattori scatenanti che determinano il passaggio da una potenziale autoreattività alla malattia autoimmune sono anche gli agenti infettivi, spesso di tipo virale, i fattori ambientali, il sesso e la perdita delle cellule regolatorie.

Le infezioni possono scatenare la malattia attraverso vari meccanismi: la presenza di antigeni virali simili ad antigeni *self*, può determinare una "cross-reazione" contro il *self*, oppure l'infezione può danneggiare i tessuti causando la liberazione di antigeni normalmente sequestrati, che sono erroneamente riconosciuti come *non self*. Questo errore della risposta immunitaria è considerato uno dei meccanismi alla base dello sviluppo di malattie autoimmuni ed è detto "*mimetismo o mimicria molecolare*". Per esempio nella sindrome di Guillain Barrè è stata dimostrata reattività crociata degli anticorpi verso il lipopolisaccaride di *C. jejuni* e i gangliosidi., umani .

Anche i fattori ambientali contribuiscono allo sviluppo delle malattie autoimmuni anche se spesso il fattore ambientale scatenante resta ignoto. Dal punto di vista clinico le malattie autoimmuni si dividono in sistemiche, come ad esempio la

sindrome autoimmune linfoproliferativa e il lupus eritematoso sistemico, e organo-specifiche, come ad esempio il diabete mellito di tipo 1, la sclerosi multipla e la tiroidite di Hashimoto. Dal punto di vista invece del meccanismo immuno-patogenetico si distinguono in malattie mediate da anticorpi, che danno origine a danni tipicamente sistemici, e mediate da cellule, che invece determinano un danno prevalentemente organo o tessuto-specifico.

La maggior parte delle malattie autoimmuni sono multifattoriali, ovvero sono causate dalla combinazione di fattori genetici e di fattori ambientali. Un'adeguata conoscenza dei geni e dei meccanismi funzionali coinvolti nell'autoimmunità permetterebbe di sviluppare terapie e piani di prevenzioni innovativi.

1.2 LA SCLEROSI MULTIPLA

La Sclerosi Multipla, è una malattia autoimmune infiammatoria del Sistema Nervoso Centrale (cervello e midollo spinale), caratterizzata da attacchi dei propri anticorpi diretti contro la mielina, una sostanza lipoproteica che costituisce la guaina che riveste parte del corpo dei neuroni, gli assoni, permettendo la trasmissione rapida e integra degli impulsi nervosi da e verso il cervello.

Nelle malattie autoimmuni un'alterazione del sistema immunitario causa l'attacco contro costituenti propri dell'organismo.

Nel caso della Sclerosi Multipla è la mielina che non viene più riconosciuta come propria.

Normalmente, nel nostro sistema immunitario i linfociti T svolgono un ruolo fondamentale di difesa da patogeni estranei al nostro organismo, come virus, batteri e allergeni.

Nella Sclerosi Multipla, queste cellule T, attaccano la mielina del sistema nervoso centrale, quindi del cervello e del midollo.

È stato dimostrato che sequenze peptidiche di agenti virali molto comuni, come il virus di Epstein Barr, il virus influenzale tipo A e il Papilloma virus umano, hanno una sequenza di amminoacidi molto simile a quella della proteina basica

della mielina (MBP).

L'immunologia conosce questo fenomeno, in grado di "confondere" il sistema immunitario, come mimetismo molecolare.

La mielina è costituita da numerose membrane sovrapposte che circondano l'assone, isolandolo dall'esterno.

In questo modo, garantisce che l'impulso nervoso non si "disperda" nell'ambiente circostante e mantenga un'elevata velocità di conduzione lungo l'assone (cento metri al secondo).

Nel corso della malattia la distruzione delle guaine mieliniche causa un rallentamento, fino al blocco, degli impulsi che vanno dal sistema nervoso centrale verso le diverse parti del corpo e viceversa.

La regione demielinizzata viene detta "placca di demielinizzazione".

È definita "multipla" per la presenza di numerosi focolai di demielinizzazione, irregolarmente disseminati nella sostanza bianca di tutto il Sistema Nervoso Centrale.

La malattia si manifesta generalmente in età giovanile, tra i 14 e i 50 anni, ma non sono rari i casi di esordio in età pediatrica.

1.3 OSTEOPONTINA

Osteopontina (OPN) è una glicoproteina acida con un peso molecolare che varia tra 25 e 80 kDa a seguito di processi post-trascrizionali a cui è sottoposta (glicosilazione, fosforilazione e taglio proteolitico ad opera della trombina). E' codificata da un gene multiallelico ed è localizzata nell'uomo sul cromosoma 4q21-q25[1]. La sua espressione è basale e costitutiva nel tessuto epiteliale ed osseo, mentre nelle cellule della muscolatura liscia, nei macrofagi e nelle cellule endoteliali è iper espressa a seguito di eventi infiammatori. OPN favorisce *in vitro* l'adesione di linfociti T e macrofagi attivati umani e murini, mentre *in vivo* provoca l'accumulo di macrofagi nei siti in cui viene iniettata. Non è prodotta dai monociti ma la sua espressione è rapidamente indotta quando i monociti vengono differenziati in macrofagi.

OPN possiede la sequenza tripeptidica "Arginina-Glicina-Aspartato" (RGD), caratteristica delle proteine della matrice extracellulare (ECM) e delle proteine del siero (come la fibronectina, la vitronectina, il collagene e il fibrinogeno) [1]. Tale dominio permette alla proteina di interagire con vari recettori integrinici, come $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ [2-3]. Questo legame è inoltre responsabile dei meccanismi di adesione di linfociti T e macrofagi.

Gli effetti di OPN sono mediati da diversi recettori, incluse le integrine sopracitate e isoforme del CD44_{v6-7} [4-5], che mediano la funzione chemotattica di OPN e riducono l'espressione di IL-10 e IL-4, le integrine, invece, mediano l'adesione di cellule B, piastrine, osteoclasti, cellule del muscolo liscio e incrementano l'espressione di IL-12 da parte dei macrofagi; infine, sia le isoforme del CD44_{v6-7} sia le integrine polarizzano comunque le cellule T verso una risposta Th1.

OPN è espressa in diverse forme funzionali prodotte a seguito di *splicing* alternativo, di fosforilazione e glicosilazione, o in seguito a varie scissioni proteolitiche operate da trombina o metalloproteasi della matrice (MMPs), soprattutto la MMP-3 e la MMP-7. In particolare i frammenti generati dalla trombina (trombin-OPN) e dalle MMPs (MMP-OPN) sembrano acquisire nuove

funzioni rispetto alla proteina intera [6-7]. Sono stati identificate tre isoforme di OPN che si generano in seguito a *splicing* alternativo: l'isoforma a (945bp) che codifica per la proteina intera, l'isoforma b (903 bp) che presenta una delezione di 14 aminoacidi nell'esone 5 e l'isoforma c (864bp) che presenta una delezione di 28 aminoacidi nell'esone 4 [8, 9].

1.4 FUNZIONI DI OSTEOPONTINA

Sono molti i processi fisiologici e patologici in cui OPN sembra coinvolta: i movimenti e la migrazione delle cellule, il rimodellamento vascolare, il riassorbimento osseo, la regolazione della produzione di ossido nitrico (NO) e la formazione di metastasi tumorali [10-11].

Inoltre OPN è coinvolta nell'infiltrazione macrofagica e linfocitaria in risposta a diversi stimoli patologici in vivo, è espressa da istiociti nei granulomi di varia provenienza (inclusa tubercolosi e sarcoidosi [12]), ed è direttamente coinvolta nella formazione e nella calcificazione delle placche dell'arteriosclerosi [13].

Precedenti lavori hanno evidenziato un'elevata produzione di OPN in topi MLR *lpr/lpr* e dimostrato che incrociandoli con topi difettivi (OPN^{-/-}), essi manifestavano un ritardo nell'attivazione policlonale dei linfociti B [14-15].

OPN gioca un ruolo importante nel favorire lo sviluppo di una risposta immunitaria di tipo-1 ed è stata chiamata, inizialmente, *Eta-1* (*early T lymphocyte activation-1*).

Essa svolge quindi la funzione di citochina per i linfociti T, che la producono nelle prime fasi della loro attivazione [16-17].

OPN aumenta l'espressione delle citochine Th1 e inibisce quella delle Th2 [18-19].

Nel topo OPN costimola i macrofagi, attivati da lipopolisaccaride, a produrre IL-12 ed inibisce la produzione di IL-10. In linea con quest'osservazione, topi *knock out* per OPN rispondono ad infezioni normalmente caratterizzate da una risposta

di tipo Th1 con una ridotta produzione di IL-12 e una aumentata produzione di IL-10 [20].

OPN indirizza quindi lo sviluppo della risposta immunitaria verso una risposta Th1 con produzione di citochine proinfiammatorie (IL-2, IFN- γ e TNF- α) e attività helper per i macrofagi; contariamente ai Th1, i Th2 producono citochine con funzione helper sui linfociti B, quali IL-4, -5, -6 e -10.

La scelta differenziativa dei linfociti Th è guidata dalle citochine presenti nel microambiente in cui avviene l'attivazione. Ad esempio, un evento fondamentale per la differenziazione a Th1 è la produzione di IL-12 da parte dei macrofagi, mentre la produzione di IL-10 inibisce questo processo [22-23-24].

Sulla base di precedenti studi sulle caratteristiche immunologiche dei pazienti con ALPS, si è visto che essi presentano una risposta preferenziale di tipo Th2 con ridotta produzione di IL-2 e IFN- γ e aumentati livelli di IL-4 e IL-5. A questo va aggiunto che in questi pazienti i livelli di IL-10 sono notevolmente aumentati a dispetto di quelli di IL-12.

In definitiva, IL-10 altera il bilancio Th1/Th2 svolgendo un ruolo da antagonista nello sviluppo dei Th1 favorendo indirettamente la linea Th2.

1.5 Osteopontina nell'autoimmunità

Nello sviluppo dell'autoimmunità nell'uomo, i ruoli di OPN sono numerosi: OPN stimola, infatti, i linfociti T a differenziarsi, proliferare e aumenta l'espressione, da parte dei linfociti stessi, di INF- γ e di CD40L con conseguente espressione di IL-12 da parte dei linfociti B [11]. Recentemente è stato dimostrato che OPN induce sopravvivenza dei linfociti T attivati, attraverso la regolazione dei fattori di trascrizione Foxo3a (forkhead box O3) e NFkB (nuclear factor-kappa B) [25].

Lo studio svolto su topi transgenici che producono elevati livelli di OPN (OPN^{+/+}) ha evidenziato un accumulo nella cavità peritoneale di un particolare tipo di linfociti denominati B1, che sono stati in passato associati con la

produzione di autoanticorpi, ipergammaglobulinemia e elevati livelli sierici di autoanticorpi [26].

Il coinvolgimento di OPN nelle malattie autoimmuni è ampiamente documentato: elevati livelli di OPN sono stati rilevati a livello delle lesioni cerebrali in pazienti affetti da SM. Il topo *knock-out* per OPN sviluppa una forma più lieve di EAE (encefalomielite autoimmune sperimentale), modello sperimentale della SM, con ricadute meno frequenti rispetto al topo *wild-type*.

1.6 ANTICORPI anti-OPN

Nuove terapie per la cura della SM arrivano dalle sperimentazioni condotte sui topi, mediante l'utilizzo delle vaccinazioni a DNA.

La tecnica consiste nell'iniezione di DNA plasmidico, codificante per un gene reporter nel muscolo scheletrico, dando come risultato l'espressione di una proteina codificata e l'induzione di una risposta immune.

E' stato osservato che nel topo l'immunizzazione con un plasmide in grado di codificare per la proteina OPN è in grado di indurre la produzione di anticorpi anti-OPN migliorando le condizioni cliniche di topi prima dell'induzione dell'EAE.

Tuttavia la presenza di auto-anticorpi rivolti verso OPN è stata rilevata, seppur a bassi livelli, in topi EAE non trattati e quindi in assenza di vaccinazione.

Si ipotizza quindi che gli auto-anticorpi per OPN possono svolgere un'azione opposta a quella proinfiammatoria svolta da osteopontina.

Attualmente non ci sono ancora dati che dimostrano l'ipotesi che anticorpi anti-OPN possano essere presenti anche in pazienti affetti da SM.

2 Sviluppo Kit ELISA con Biglie Magnetiche

2.1 ELISA

ELISA è l'acronimo di Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Dosaggio Immune Adsorbito Legato a un Enzima). Si tratta di un versatile metodo di analisi immunologica per rilevare la presenza di un dato antigene grazie all'uso di uno specifico anticorpo (ELISA DIRETTO) oppure di un anticorpo specifico contro un antigene (ELISA INDIRETTO).

La versatilità del saggio ELISA è apprezzata nel campo della ricerca che nel campo sanitario dove, in particolar modo, è necessario produrre delle diagnosi precise ed economiche. Esistono in commercio numerosi KIT i cui campi di azione si articolano su diversi bersagli antigenici e, anche per questo, l' ELISA è un saggio di prima scelta nei piccoli laboratori e nelle grandi strutture sanitarie.

2.2 ELISA DIRETTO con microsfere magnetiche

Alternativa ai normali saggi ELISA diretti o a sandwich per la rilevazione di un antigene presente in un campione biologico è rappresentata dall'innovativa metodica ELISA la quale prevede l'utilizzo di microsfere magnetiche abbinata a piastre ELISA di tipo Convex.

In un normale ELISA diretto l'anticorpo di cattura specifico per un determinato antigene viene fatto aderire ad un substrato in PVC o nitrocellulosa. In questa metodica invece, l'anticorpo viene fatto aderire a microsfere magnetiche.

Nella fase successiva le microsfere (biglie magnetiche), legate con anticorpo di cattura, vengono miscelate all'interno dei pozzetti delle piastre convex con il campione biologico al fine di formare il complesso anticorpo-antigene. Le fasi

successive dell'ELISA rispettano poi le normali procedure di un ELISA tradizionale a sandwich.

Vi è infatti la fase di incubazione con anticorpo di detection marcato con un enzima quale perossidasi o fosfatasi alcalina e la fase di sviluppo in cui viene inserito un opportuno substrato che in presenza dell'enzima provoca una variazione di colore che poi verrà letta mediante un lettore di piastre.

Tra le varie fasi vengono effettuati lavaggi con PBS e Tween-20.

Nella metodica con le biglie magnetiche l'unica differenza consiste nell'utilizzo di uno speciale tappetino magnetico appositamente progettato per le piastre Convex il quale permette di attrarre le sfere magnetiche sul fondo del pozzetto e di consentire le fasi di lavaggio dei pozzetti eliminando il liquido e non le biglie.

SCOPO

Scopo 1: auto-anticorpi OPN

Lo scopo del progetto è quello di ricercare la presenza di auto-anticorpi verso OPN in pazienti affetti da SM nelle diverse fasi cliniche della malattia. Questo al fine di effettuare studi preclinici e valutarne un loro uso per una immunizzazione attiva e passiva verso OPN nella terapia alla Sclerosi Multipla.

OPN sembra infatti svolgere un ruolo nell'autoimmunità e nella risposta infiammatoria sia nella EAE che nella SM.

La ricerca degli anticorpi verrà effettuata grazie all'utilizzo di un saggio ELISA "home made" il quale prevede l'uso di OPN umana fatta aderire al fondo di piastre ELISA ed usata come cattura degli anticorpi anti-OPN.

Scopo 2: Sviluppo Kit ELISA

Il progetto prevede lo sviluppo di un nuovo ed innovativo saggio ELISA basato sull'utilizzo di microsfere magnetiche abbinato ad una piastra ELISA convex.

Le finalità è quella di ottenere una metodica semplice, veloce e con una maggiore sensibilità rispetto ai convenzionali metodi ELISA posti in commercio per la rilevazione di citochine o anticorpi.

Lo sviluppo di questo metodo potrebbe essere importante non solo per lo sviluppo di Kit diagnostici (Th1/Th2) per la determinazione di citochine umane ma anche al fine della ricerca di anticorpi anti-osteopontina.

Materiali e metodi

1 Anticorpi anti-OPN

Campioni utilizzati:

Sono stati utilizzati per i saggi ELISA 12 sieri di pazienti affetti da SM in fase clinica della malattia RR (recidivante remittente) e 6 sieri di controllo appartenenti a persone sane.

ELISA INDIRETTO per la ricerca di auto-anticorpi

La metodica prevede l'utilizzo di piastre ELISA (maxiSorp-Nunc) alle quali viene fatta aderire osteopontina ricombinante umana (rhOPN) (R&D) in PBS 1X. Dopo incubazione overnight a 4° C e successivi 3 cicli di lavaggio per eliminare l'Ag non assorbito si blocca la piastra con 200 µl di PBS+BSA 1% per 30 minuti. Tre lavaggi con PBS+Tween 0,05% e incubazione di siero (alla diluizione prescelta) 100 µl per 2 ore a RT. Sei lavaggi con PBS+Tween 0,05% e rilevazione degli anticorpi reattivi verso OPN con anti-human Ig diluito 1:10000 (Biolegend) o con anti-human IgG diluito 1:6000(Dako).La densità ottica è stata misurata a 450 nm con un lettore di piastre ELISA.

2 Biglie manetiche

ELISA sandwich per determinazione Human-IgG

La metodica prevede l'utilizzo di piastre ELISA (maxiSorp-Nunc). Incubazione overnight a temperatura ambiente con anticorpo di cattura anti-human IgG diluito 1:300 in PBS (100 μ l). Bloccaggio piastra con 200 μ l di PBS+2% BSA, 1 h a RT.

Aggiunta di 50 μ l di standard o campione ed incubare 1 h a RT.

Rilevazione Ag con anti-human IgG coniugato con fosfatasi alcalina diluito 1:150 in PBS+BSA2% (50 μ l).

Rilevazione con substrato pNPP 100 μ l. Soluzione di Stop NaOH 3 M (50 μ l).

Tra un passaggio e l'altro vengono effettuati 3 lavaggi con PBS+0,02% Tween-20.

Lettura con lettore di piastre ottico a 405 nm. Gli anticorpi utilizzati della ditta Rockland.

ELISA Biglie Adsorbimento

Bloccaggio piastra Convex con PBS+BSA1% (300 μ l) a temperatura ambiente per 2 ore. Tre fasi di lavaggio con PBS+Tween-20 0,05 %.

Aggiunta di 50 μ l di biglie precedentemente attivate e legate con anticorpo di cattura in ogni pozzetto (anti-human IgG). Aggiunta dello standard o campione biologico (100 μ l) da miscelare alle biglie nel pozzetto e incubazione di 1 ora a temperatura ambiente. Tre lavaggi con PBS+Tween-20 0,05 %. Incubazione di un ora a temperatura ambiente con anti-human IgG coniugato con fosfatasi alcalina diluito 1:150 in PBS+BSA 1% (50 μ l). Tre lavaggi con PBS+Tween-20 0,05 %.

Rilevazione con substrato pNPP (Sigma) 100 μ l. Soluzione di Stop NaOH 3 M

(50 μ l). Il tempo di sviluppo è di 8 minuti. Lettura con lettore di piastre ottico a 405 nm.

Tutte le fasi di lavaggio avvengono posizionando la piastra Convex su apposito tappetino magnetico per 30 secondi al fine di attirare e bloccare le biglie magnetiche sul fondo del pozzetto.

Gli anticorpi utilizzati della ditta Rockland.

Elisa con biglie magnetiche funzionalizzate con gruppo tosilico

Bloccaggio piastra Convex con PBS+BSA1% (300 μ l) a temperatura ambiente per 2 ore. Tre fasi di lavaggio con PBS+Tween-20 0,05 %.

Aggiunta di 50 μ l di biglie precedentemente attivate e legate con anticorpo di cattura in ogni pozzetto (anti human IgG). Aggiunta dello standard o campione biologico (100 μ l) da miscelare alle biglie nel pozzetto e incubazione di 1 ora a temperatura ambiente. Tre lavaggi con PBS+Tween-20 0,05 %. 1 ora a temperatura ambiente con anti-human IgG coniugato con fosfatasi alcalina diluito 1:150 in PBS+BSA 1% (50 μ l). Tre lavaggi con PBS+Tween-20 0,05 %.

Rilevazione con substrato pNPP 100 μ l. Soluzione di Stop NaOH 3 M (50 μ l).

Lettura con lettore di piastre ottico a 405 nm.

Tutte le fasi di lavaggio avvengono posizionando la piastra Convex su apposito tappetino magnetico per 30 secondi al fine di attirare e bloccare le biglie magnetiche sul fondo del pozzetto.

Gli anticorpi utilizzati sono della ditta Rockland.

Preparazione Microsfere superparamagnetiche per Adsorbimento con anti-human IgG

Concentrazione di utilizzo 1%.

Tre fasi di lavaggio delle biglie con buffer di Adsorbimento.

Incubazione overnight a 4°C in leggera agitazione con anticorpo di cattura (anti-human IgG) 1 mg/ml. Tre lavaggi con buffer di Adsorbimento.

Bloccaggio biglie magnetiche per 3 ore a temperatura ambiente in leggera agitazione con soluzione di bloccaggio.

Tre lavaggi con wash buffer e risospensione in reagente di stoccaggio.

La metodica prevede l'utilizzo di Magnetoblock per tenere bloccate le biglie durante le fasi della preparazione.

I dati relativi alle soluzioni di utilizzo sono presenti nel protocollo fornito dalla ditta BIOCI.

Preparazione Microsfere superparamagnetiche funzionalizzate con gruppo tosilico con anti-human IgG.

La preparazione delle biglie magnetiche viene effettuata seguendo il protocollo fornito dalla ditta BIOCI.

RISULTATI

ELISA per la ricerca in sieri SM di anticorpi anti-OPN

La ricerca di anticorpi anti-OPN (IgG) è stata effettuata mediante un saggio ELISA diretto, utilizzando OPN ricombinante umana come Ag di cattura di possibili auto-anticorpi rivolti verso questa proteina.

Nel dettaglio si è andata a ricercare la presenza di anticorpi nel siero di pazienti affetti da Sclerosi Multipla nella fase clinica RR e si sono valutate le differenze con sieri di controlli sani.

Dai risultati ottenuti su 12 sieri di pazienti e su 6 controlli, utilizzando una quantità di osteopontina ricombinante come cattura di 10 ng e anticorpo di rilevazione anti-human Ig, non emergono sostanziali differenze nei valori di densità ottica come da rilevazione al lettore ottico a 450 nm.

La mediana delle densità ottiche dei pazienti risulta di 0,544, leggermente superiore a quella dei controlli di 0,492 (Tab.1).

Tuttavia, se poniamo come valore soglia il 95° percentile calcolato sui controlli, emerge che 4 sui 12 pazienti supera questo livello.

I successivi esperimenti sono stati effettuati prendendo in analisi solo 2 sieri SM, in particolare quelli che hanno dato valori di densità ottica maggiori nel precedente esperimento.

Si sono allestiti due ELISA in parallelo, uno utilizzando come anticorpo di detection anti-human Ig e l'altro con anti-human IgG. Il quantitativo di osteopontina ricombinante utilizzata come cattura è stata di 100 ng e per ciascun siero sono state analizzate diverse diluizioni.

I risultati mostrano che per la diluizione 1:2, vi sia una più marcata differenza in termini di densità ottica tra pazienti e controlli, se messa in paragone con le densità ottiche dell'esperimento precedente.

Per i sieri maggiormente diluiti si osserva invece un livellamento dell'intensità del segnale tra pazienti e controlli.

In termini di densità ottica rilevata i due anticorpi di rivelazione non mostrano particolari differenze (Tab 2 e 3).

Dalle densità ottiche dei due sieri SM e dei controlli in un saggio con 300 ng di osteopontina adesa alla piastra ELISA e rilevazione con anti-human IgG non notiamo sostanziali differenze rispetto al test effettuato con 100 ng di proteina. (Tabella 4)

SM	O.D.	CTR	O.D.
SM1	0,815	CTR1	0,478
SM2	0,698	CTR2	0,367
SM3	0,513	CTR3	0,436
SM4	0,65	CTR4	0,523
SM5	0,634	CTR5	0,624
SM6	0,319	CTR6	0,506
SM7	0,323	Mediana	0,492
SM8	0,576	Percentile	0,59875
SM9	0,459		
SM10	0,336		
SM11	0,387		
SM12	0,582		
Mediana	0,544		

Tab.1: Livelli densità ottica di 12 sieri SM e 6 controlli con diluizione 1:2

Diluizione sieri	CTR 1	CTR2	SM 1	SM 2	Bianco
1 : 2	0,791	0,811	1,174	1,806	0,062
1 : 25	0,352	0,410	0,445	0,649	
1 : 50	0,347	0,312	0,355	0,448	
1 : 100	0,287	0,246	0,303	0,306	
1 : 200	0,245	0,200	0,238	0,235	

Tab.2: Valori medi densità ottica di due controlli e due pazienti. Anticorpo di detection: anti-human IgG e 100 ng di OPN come cattura

Diluizione sieri	CTR 1	CTR 2	SM 1	SM 2 Bianco	
1 : 2	0,939	0,743	1,329	1,926	0,044
1 : 25	0,430	0,385	0,336	0,596	
1 : 50	0,368	0,311	0,302	0,469	
1 : 100	0,345	0,283	0,230	0,366	
1 : 200	0,278	0,230	0,245	0,335	

Tabella3: Valori medi densità ottica di due controlli e due pazienti. Anticorpo di detection: anti-human Ig e 100 ng di OPN come cattura

Diluizione sieri	CTR 1	CTR 2	SM 1	SM 2 Bianco	
1 : 2	0,602	0,676	0,569	1,88	0,059
1 : 25	0,304	0,25	0,317	0,628	
1 : 50	0,303	0,215	0,279	0,426	
1 : 100	0,264	0,184	0,252	0,319	
1 : 200	0,2	0,154	0,205	0,059	

Tabella4: Valori medi densità ottica di due controlli e due pazienti. Anticorpo di detection: anti-human IgG e 300 ng di OPN come cattura

ELISA con biglie magnetiche per la determinazione delle IgG umane

Nella prima fase del progetto l'attenzione è stata indirizzata sulla messa a punto delle condizioni standard per l'esecuzione di questo nuovo saggio ELISA basato sull'utilizzo di biglie magnetiche legate con anticorpo di cattura per un determinato antigene.

Come primo step è stato messo a punto un tappetino magnetico in grado di attirare e bloccare le biglie in maniera efficiente al fondo delle piastre convex. Questo al fine di effettuare le fasi di lavaggio e le rispettive incubazioni con i relativi anticorpi e enzimi senza perdere materiale. Questo risulta anche importante ai fini di una buona lettura delle densità ottiche, infatti nella fase di lettura della piastra, non devono essere presenti biglie in soluzione, ma fissate al fondo. Eventuali biglie in sospensione possono infatti interferire e alterare il valore della densità ottica. Il cammino ottico deve quindi essere privo di biglie.

Nel secondo step invece si sono eseguiti diversi saggi ELISA i quali hanno previsto l'utilizzo di due tipologie di biglie magnetiche: biglie magnetiche per Adsorbimento e biglie magnetiche funzionalizzate con gruppo tosilico.

E' stato preso come riferimento un ELISA commerciale per la determinazione delle human IgG della ditta Rockland, il quale fornisce una curva standard da 250 a 3,9 ng/ml (Fig.1).

Negli esperimenti con biglie magnetiche sono ovviamente stati utilizzati gli stessi anticorpi e reagenti impiegati nell'ELISA commerciale.

I risultati migliori si sono ottenuti mediante l'utilizzo delle biglie magnetiche funzionalizzate con gruppo tosilico, le quali permettono la formazione di un legame covalente con l'anticorpo di cattura.

Con queste biglie è possibile la costruzione di curva standard lineare con R^2 di 0,999 e il range di concentrazione rilevabile delle IgG è compreso tra 125 e 3,9 ng/ml. Questi dati si riferiscono all'utilizzo di 50 μ l di biglie(Fig.2).

Utilizzando 75 μ l di biglie è possibile incrementare la sensibilità del saggio ELISA fino 1,9 ng/ml (Fig3).

I risultati per quanto riguarda le biglie per adsorbimento, mostrano una non discriminazione per concentrazioni inferiori ai 7,8 ng/ml.

L'utilizzo di queste biglie tuttavia permette, anche se non con livelli di precisione non accurati e sensibili, una discriminazione per valori compresi tra 500 e 15,6 ng/ml. In questo range la costruzione di una curva risulta possibile ma con livelli di R^2 bassi (Fig.4).

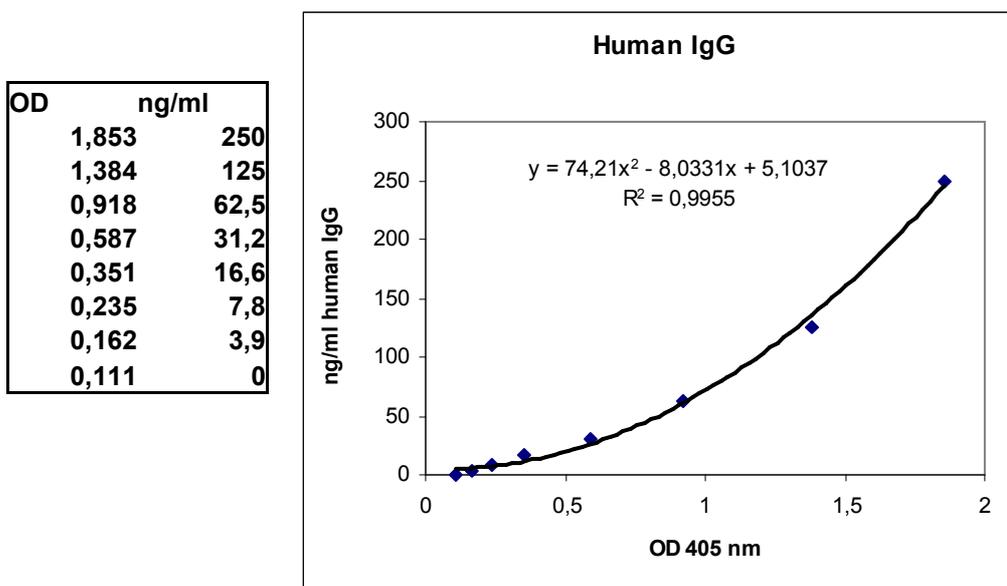


Fig.1 Curva standard ELISA commerciale per human IgG..

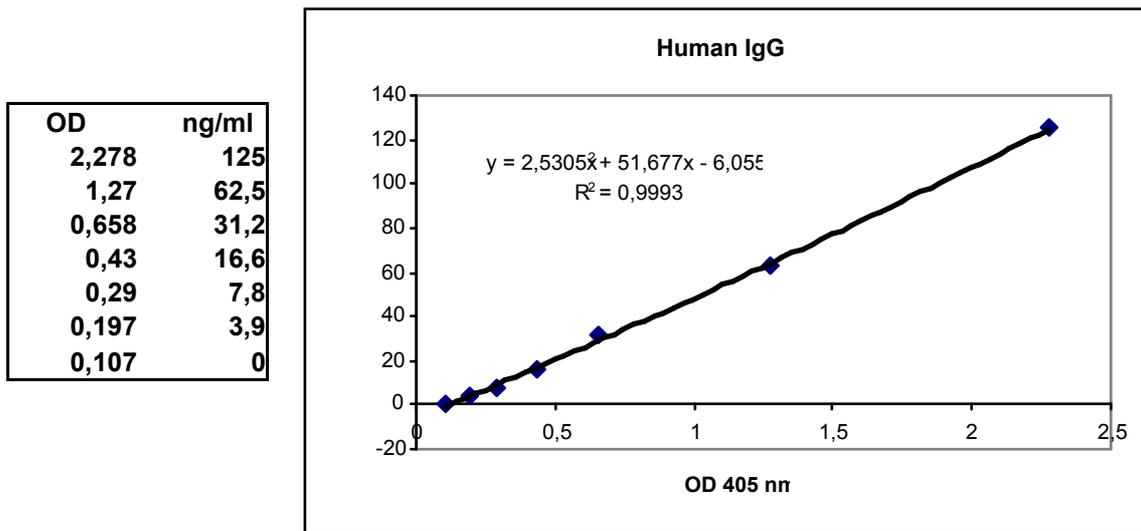


Fig. 2 Curva standard per la deteminazione delle IgG umane con 50 µl di biglie magnetiche tosiliiche.

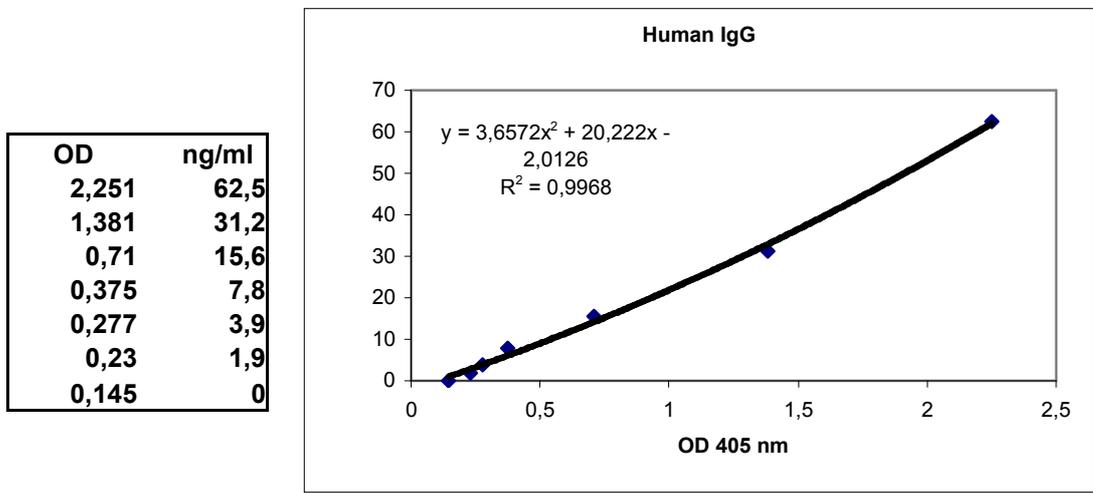


Fig.3 Curva standard per la deteminazione delle IgG con 75 µl di biglie magnetiche tosiliiche

OD	Ng/ml
2,819	500
1,11	250
0,925	125
0,6	62,5
0,29	31,2
0,2	15,6
0,183	0

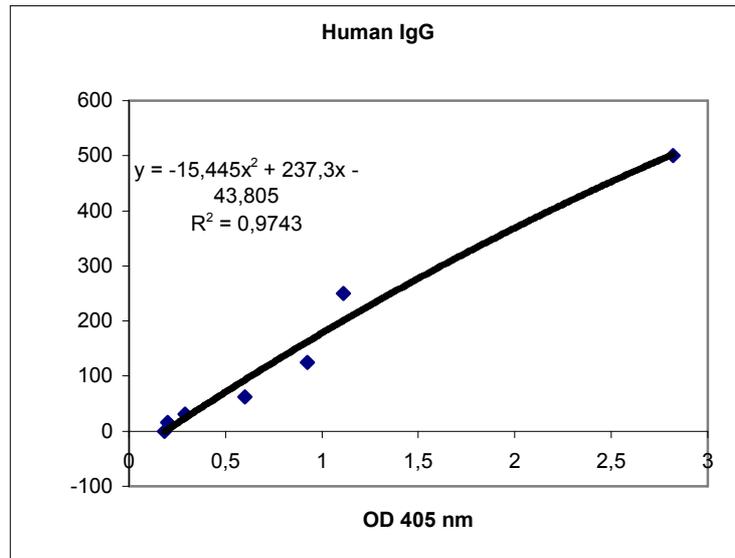


Fig.4: Curva standard IgG con 50 µl di biglie magnetiche tosiliiche

Discussione

ELISA diretto per la ricerca di anticorpi anti-OPN in sieri di pazienti SM

I risultati ottenuti fino ad ora, mediante l'utilizzo del saggio ELISA sviluppato nel nostro laboratorio, sono da considerarsi preliminari e non permettono ancora di trarre conclusioni sull'effettiva presenza di auto-anticorpi per OPN in sieri di pazienti affetti da SM.

Le assorbanze rilevate dai saggi ELISA presubilmente possono essere attribuite alla presenza di auto-anticorpi reattivi verso OPN, tuttavia non è escludibile che questi valori siano falsati da legami aspecifici dati da reagenti o da altri anticorpi (IgG) presenti nel siero umano.

Per una conferma di tali risultati, sarà quindi necessario effettuare dei western blot, utilizzando i sieri per rilevare la presenza di OPN.

Dalle analisi, emerge che il quantitativo di OPN usato per il coating delle piastre è fondamentale ai fini di cattura degli auto-anticorpi.

Infatti, se per quantitativi di OPN bassi (10 ng), non si sono osservate differenze significative tra sieri di pazienti e controlli, utilizzando un quantitativo di OPN maggiore (100/300 ng) le variazioni in termini di densità ottiche rilevate sono state ben maggiori. Questo porterebbe ad ipotizzare un saturamento da parte degli auto-anticorpi in caso di poco antigene utilizzato come cattura.

ELISA con biglie magnetiche

I risultati preliminari sull'utilizzo di questa nuova metodica ELISA basata sull'utilizzo di biglie magnetiche in grado legare anticorpi o antigeni, hanno messo in evidenza alcune differenze tra biglie per adsorbimento o tosil attivate.

Mentre le biglie tosil attivate sono in grado di migliorare il livello di sensibilità nella rilevazione delle human IgG, come si può osservare nei risultati, garantendo la costruzione di una curva standard con una buona linearità, le biglie magnetiche per adsorbimento non garantiscono gli stessi risultati.

Questo è attribuibile, con molta probabilità, al tipo di legame che sussiste tra biglia e anticorpo di cattura.

Nelle biglie tosiliche, infatti si ha la formazione di un vero e proprio legame covalente tra anticorpo di cattura e biglia. Nelle biglie per adsorbimento, invece, non vi sono legami covalenti, ma solo deboli interazioni tra anticorpo e biglia.

Nelle varie fasi di incubazione e lavaggio questi deboli legami potrebbero rompersi con conseguente distacco dell'anticorpo di cattura verso un determinato antigene. I valori in termini di efficienza e sensibilità sarebbero così drasticamente ridotti.

Prospettive future 1

Tra le prospettive future vi è quella di aumentare il numero di campioni da analizzare. Campioni di pazienti SM nelle diverse fasi cliniche della malattia e anche di controlli sani.

Si cercherà quindi di correlare i livelli sierici di OPN con il quantitativo di auto-anticorpi prodotti.

Si prevede successivamente l'utilizzo di anticorpi anti-OPN, purificati con tecniche biochimiche, per comprendere i meccanismi che essi svolgono nell'attivazione immunitaria in vitro.

Prospettive future 2

Tra le prospettive future vi è il perfezionamento del metodo ELISA, cercando di ottenere migliori sensibilità e un ampliamento dei range di concentrazioni rilevate.

Inoltre si effettueranno test al fine ottimizzare la metodica, permettendo rilevazione di diversi tipi di citochine.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Rouslati E, Piersbacher MD. New perspectives in cell adesion: RGD and integrins. *Science*. 238: 491-7, 1987.
- [2] Bayless KJ, Davis GE. Identification of dual alpha 4beta1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. *J Biol Chem*, 276:13483-13489, 2001.
- [3] Smith LL, Greenfield BW, Aruffo A, Giachelli CM. CD44 is not an adhesive receptor for osteopontin. *J Cell Biochem*. 73: 20-30, 1999.
- [4] Liaw L, Linder V, Schwartz SM, Chambers AF, Giacelli CM. Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ Res*. 77: 665-672, 1995.
- [5] Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V, Wesson JA, Johnson R, Hughes J. Osteopontin--a molecule for all seasons. *QJM*. 95:3-13, 2002.
- [6] Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1) *Science* 271:509-512, 1996.
- [7] Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Martrisan LM, Havrda MC, Liaw L. Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J Biol Chem*. 276: 28261-28267, 2001.
- [8] Williams S, Barnes J, Wakisaka A, Osaga H, Liang CT. Treatment of osteoporosis with MMP inhibitors. *Ann N Y Acad Sci*. 878:191-200, 1999.

- [9] Young MF, Kerr JM, Thermane JD. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN). *Genomics*. 7: 491-502, 1990.
- [10] Giacomelli F, R. Marciano, A. Pistorio, P. Catarsi, S. Caninoi, G. Karsenty and R. Ravazzolo Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol. Genomics*. 20: 87-96, 2004.
- [11] Adler B, Ashkar S, Cantor H, Weber GF. Costimulation by extracellular matrix proteins determines the response to TCR ligation. *Cell Immunol.*210:30-40, 2001.
- [12] Akahoshi M, Nakashima H, Tanaka Y, Kohsaka T, Nagano S, Ohgami E, Arinobu Y, Yamaoka K, Niino H, Shinozaki M, Hirakata H, Horiuchi T, Otsuka T, Niho Y. Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 42:1644-1648, 1999.
- [13] Nagai S, Hashimoto S, Yamashita T, Toyoda N, Satoh T, Suzuki T, Matsushima K. Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1-and T(h)2-polarized cells. *Int Immunol*. 13:367-376, 2001.
- [14] Hur E.M., Youssef S., Haws M.E., Zhang S.Y., Sobel R.A. and Steinman L. Osteopontin-induced relapse and progression of autoimmune brain disease through enhanced survival of activated T cells. *Nature Immunology*.8: 74-83, 2007.
- [15] Iizuka J, Katagiri Y, Tada N, Muakami M, Ikeda T, Sato M, Hirokawa K, Okada S, Hatano M, Tokuhisa T, Uede T. Introduction of an osteopontin gene confers the increase in B1 cell population and the production of anti-DNA autoantibodies. *Lab Invest*. 78:1523-1533, 1998.

- [16] Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M, et al. Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *J Neuroimmunol.* 163:172-178, 2005.
- [17] Blom, T.; Franzen, A.; Heinegard, D.; Holmdahl, R. : Comment on 'The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease.' *Science.* 299: 1845, 2003.
- [18] Mishima R, Takeshima F, Sawai T, Ohba K et al. High plasma osteopontin levels in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol;* 41:167-172, 2007.
- [19] Clementi R, Dagna L, Dianzani U, et al. Inherited perforin and Fas mutations in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome and lymphoma. *New Eng J Med.* 351:1419-1424, 2004.
- [20] Vendrame F, Santangelo C et al. Defective lymphocyte caspase-3 expression in type 1 diabetes mellitus. *Eur. J. Endocrinol.* 152: 119. 2005

SEMINARI interni al Dipartimento di Scienze Mediche AA 2008-2009

Production of biopharmaceuticals in plants

Prof. L. Santi

5/12/08

Utilizzo delle cellule staminali mesenchimali nelle malattie neurologiche

Prof. A. Uccelli

12/12/08

La malattia celiaca

Prof. R. Troncone

9/01/09

Porpora trombocitopenia autoimmune: nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici

Prof. F. Zaja

13/01/09

Interazioni geni-ambiente nell'eziologia della sclerosi multipla: studi su gemelliù

Prof. M. Salvetti

27/01/09

Non solo motoneuroni: il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica

Prof. A. Musarò

10/2/09

Ruolo dei polimorfismi dei geni della pigmentazione nell'induzione di mutazioni somatiche nei melanomi

Prof.ssa. G. Bianchi Scarrà

12/2/09

The use of the cytomegalovirus as a novel vaccine vector for Simian immunodeficiency virus

Prof. Jay A. Nelson

19/2/09

When a fine tuner of signaling pathway becomes a dangerous amplifier: the case of the proline isomerase Pin1 in cancer

Prof. G. Del Sal

20/2/09

Il metabolismo degli endocannabinoidi e la sua rilevanza terapeutica

Prof. M. Maccarone

26/2/09

La proteomica un nuovo modo di guardare al mondo delle proteine

Prof. P Pucci

18/3/09

Cellule staminali tumorali implicazioni terapeutiche

Prof. G. Stassi

18/3/09

Le nanotecnologie applicate alla medicina

Prof. Peluso

19/3/09

Regulation of integrin functions in vascular system

Prof. F. Bussolino

26/3/09

Carcinoma differenziato della tiroide: novità nel follow-up e nella terapia

Prof.ssa B. Biondi

2/4/09

I bioreattori nella medicina rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up

Dott.ssa S. Mantero

9/4/09

Patologie dei tumori neuro-cerebrali: recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi

Dott. D. Schiffer

22/4/09

Polycystin-1 , the product of the PDK1 gene mutated in Autosomal Dominant Polycystic Disease (ADPKD) is an orphan receptor regulating cell migration and polarity

Dott.ssa A. Boletta

28/4/09

Polarized inflammation in tumor development

Prof. A. Sica

30/4/09

Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo

Prof. A. Columbo

5/5/09

Integrated nanoparticle- biomolecule hybrid system: design of stimuli-responsive nanomaterials for cancer diagnosis and therapy

Dott.ssa B. Palazzo

6/5/09

Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana
Prof. G. Poli
12/5/09

Neutotossicità delle proteine misfolded nelle malattie del motoneurone
Prof. A. Poletti
12/5/09

Functional genomics of brain
Prof. S. Gustincich
13/5/09

Marcatori molecolari nel carcinoma coloretale: dalla terapia alla pratica clinica
Prof. M. Frattini
10/6/09

Il lupus eritematoso cutaneo: quadro clinico e immunopatologico
Prof. E. Berti
6/7/09