



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Farmacologiche

INDIRIZZO: Farmacologia Molecolare e Cellulare

CICLO: XXV

**INDAGINE SUI MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DELL'EFFICACIA
TERAPEUTICA DELLE IMMUNOGLOBULINE G UMANE.**

STUDI SU HUVECS (HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS) E SU
PBMCs (PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS)

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Supervisore: Ch.mo Prof. Paola Finotti

Dottorando: Giulia Frigo

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
1. IMMUNOGLOBULINE	5
1.1 Premessa	5
1.2 Struttura generale delle Ig	5
1.2.1 Tipologia delle catene che formano una Ig	7
1.2.2 Il sito di legame con l'antigene	8
1.3 Caratteristiche delle subunità delle Ig	9
1.4 Isotipi delle Ig	11
1.4.1 IgA	12
1.4.2 IgD	13
1.4.3 IgE	13
1.4.4 IgG	14
1.4.5 IgM	15
1.5 Sintesi delle Ig	16
1.5.1 Organizzazione dei geni delle Ig	17
1.6 La glicosilazione delle Ig	19
2. FARMACODINAMICA DELLE Ig	22
2.1 Interazioni delle Ig con proteine circolanti	23
2.1.1 I complessi non-immuni	23
2.1.2 I complessi immuni	24
2.2 Interazioni delle Ig con proteine di struttura (recettore)	24
2.2.1 Recettori FcγR	25
2.2.2 Recettore FcRn	26
3. FARMACOCINETICA DELLE Ig	28
4. SITUAZIONI PATOLOGICHE CHE SI ASSOCIANO AD ALTERAZIONI DELLE Ig	30
4.1 Alterazioni quantitative	30
4.2 Alterazioni qualitative	31
5. APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DELLE Ig	31
5.1 Cenni storici	31
5.2 Indicazioni cliniche per la terapia con IgG	32
6. MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DEGLI EFFETTI TERAPEUTICI DELLE IgG	33

OBIETTIVI DELLA TESI	37
MATERIALI	39
METODI	41
1. ESPERIMENTI DI PURIFICAZIONE DELLE IgG DA PLASMA UMANO	41
1.1 Cromatografia per affinità	41
1.2 Dialisi	43
1.3 Determinazione della concentrazione proteica	43
1.3.1 Metodo spettrofotometrico di assorbimento UV	44
1.4 Liofilizzazione	45
2. ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA	45
2.1 Elettroforesi	45
2.2 SDS-PAGE	46
2.3 <i>Western blotting</i>	48
2.4 Misurazione dell'attività proteolitica	50
2.4.1 Zimografia	50
3. ESPERIMENTI SU COLTURE CELLULARI	51
3.1 <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> (HUVECS)	51
3.1.1 Coltura e trattamento delle HUVECS	51
3.1.2 Tests di vitalità cellulare e proliferazione	52
3.1.2.1 Saggio di esclusione del <i>Trypan blue</i>	52
3.1.2.2 Saggio di proliferazione	53
3.1.3 Analisi dell'espressione proteica su lisati cellulari	54
3.1.4 Real-Time PCR	55
3.1.4.1 Estrazione dell'RNA totale	56
3.1.4.2 Quantificazione spettrofotometrica dell'RNA	58
3.1.4.3 Retro-trascrizione dell'RNA totale e sintesi del cDNA	58
3.1.4.4 PCR Real-Time Quantitativa	58
3.1.5 Analisi di espressione proteica mediante immunofluorescenza	60
3.1.6 Analisi dei terreni di coltura cellulare	61
3.1.7 <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (ELISA)	62
3.2 <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (PBMCs)	63
3.2.1 Purificazione e coltura dei PBMCs	63
3.2.2 Saggio di proliferazione	65
3.2.3 Analisi dei lisati cellulari	66
3.2.4 Analisi dei terreni di coltura cellulare	66
3.2.5 ELISA	66

4. ANALISI DEI DATI	66
RISULTATI	67
1. EFFETTI DELLE IgG SULLE HUVECS	67
1.1 Modificazioni morfologiche	67
1.2 Effetti sull'espressione cellulare e secrezione di proteine di rilievo	68
1.3 Vie di segnale coinvolte nell'induzione di forme nuove di HSPs e di MMP-9	71
1.4 Effetti delle IgG sulle HUVECS dopo trattamento di durata più breve dell'incubazione	73
1.4.1 Effetti morfologici	73
1.4.2 Effetti sull'espressione cellulare e secrezione di proteine di rilievo	74
1.5 Effetti delle IgG sull'espressione e secrezione di nuove IgG	76
1.5.1 Effetti per trattamento continuo e parziale con IgG. Analisi con <i>Western blotting</i>	76
1.5.2 Espressione " <i>ex-novo</i> " e secrezione di IgG nel mezzo di coltura	78
1.6 Coinvolgimento del recettore FcRn nella sintesi " <i>ex-novo</i> " e nella secrezione di IgG	79
2. EFFETTI DELLE IgG SUI PBMCS	83
2.1 Modificazione morfologiche	83
2.2 Effetti sull'espressione cellulare di HSPs, IgG e FcRn	87
2.3 Effetti sulla secrezione di IgG nel mezzo di coltura	90
DISCUSSIONE	93
BIBLIOGRAFIA	97

RIASSUNTO

Le immunoglobuline G (IgG) umane sono sempre più frequentemente usate nella terapia di un'ampia varietà di malattie di natura immunitaria. Nonostante il loro largo impiego, non si conosce ancora il preciso meccanismo molecolare alla base degli effetti benefici riscontrati in queste patologie e le numerose ipotesi formulate riguardano prevalentemente gli effetti esplicati sulle cellule dell'immunità e i loro prodotti di secrezione o su recettori specifici delle IgG.

Dal momento che le IgG terapeutiche vengono somministrate per via endovenosa, in questo lavoro si è voluto verificare l'ipotesi che le IgG potessero esplicare degli effetti sulle cellule endoteliali vascolari con le quali sono costantemente a contatto. Allo scopo, sono state utilizzate cellule endoteliali di cordone ombelicale umano (HUVECs) che mantengono le caratteristiche delle cellule dell'immunità nativa, su cui sono stati testati gli effetti di concentrazioni scalari di IgG (0.1, 0.5 e 1.0 mg/ml) purificate da plasma umano di soggetti sani, valutando le modificazioni morfologiche e misurando l'espressione di Heat Shock Proteins (HSPs) e della metallo proteasi-9 (MMP-9) a tempi e con modalità di incubazione diversi. I risultati hanno dimostrato che le IgG provocano delle significative modificazioni nel fenotipo cellulare compatibili con una trasformazione simil-angiogenetica dipendente dalla concentrazione delle IgG e dal tempo di incubazione, l'effetto massimo essendo visibile dopo 20 h già con 0.5 mg/ml di IgG. Alla base di questo effetto è stata riconosciuta un'intensa stimolazione dell'espressione di nuove forme di HSP90, HSP70 e di MMP-9 a sua volta dipendente dall'attivazione della via metabolica cellulare PI3K/Akt, mentre non risultava coinvolta la via MEK-ERK1/2. La misurazione dell'espressione e dell'attività delle proteine nei terreni di coltura identificava come responsabile della trasformazione morfologica delle HUVECs una forma proteoliticamente inattiva della MMP-9 in complesso con HSP90 e HSP70, a condizione comunque che lo stimolo delle IgG fosse prolungato nel tempo. La misurazione dell'espressione delle IgG nei lisati cellulari e nei terreni mediante tecniche di *Western blotting* ed ELISA, assieme all'analisi dell'espressione genica delle IgG dopo trattamento condotto con modalità diverse di incubazione con IgG, evidenziava la capacità delle IgG di stimolare la loro stessa espressione e secrezione. La sintesi "*ex-novo*" di IgG comunque era un processo che innescato dal contatto relativamente breve con le IgG si manteneva nel tempo anche dopo l'allontanamento

Riassunto

dello stimolo. Nel fenomeno era coinvolto attivamente anche il recettore FcRn la cui espressione era indotta solo nelle cellule trattate con IgG e risultava anche secreto assieme alle IgG a riprova del suo coinvolgimento non solo nel processo di assorbimento ma anche di secrezione delle IgG indotte *ex-novo*. Gli esperimenti di immunofluorescenza indirettamente confermavano come gli effetti sulle HUVECs fossero dipendenti dalla internalizzazione, recettore-mediata delle IgG evidenziate in numerose vescicole endocitiche a localizzazione citoplasmatica.

Esperimenti analoghi condotti in parallelo su cellule mononucleate del sangue periferico di tre soggetti sani, dimostravano la capacità delle IgG di indurre modificazioni morfologiche a carico dei linfociti associate alla stimolazione della produzione ed escrezione di nuove IgG, effetti dipendenti nella loro entità dalle caratteristiche basali del sistema immunitario dei singoli soggetti.

I risultati ottenuti hanno rivelato che le IgG sono in grado di indurre la sintesi e secrezione di nuove IgG da cellule fisiologicamente non deputate a tale funzione come le cellule endoteliali. Questo nuovo effetto delle IgG, mai descritto in precedenza, può essere utile da un punto di vista terapeutico in quanto, in aggiunta alla stimolazione indotta sulle cellule dell'immunità, può potenziare e prolungare nel tempo la risposta immunitaria legata alla somministrazione endovenosa delle IgG. Il meccanismo di sintesi "*ex-novo*" delle IgG nelle cellule endoteliali appare indipendente da quello responsabile dell'effetto di trasformazione morfologica che è invece un evento che richiede l'applicazione di uno stimolo più intenso e prolungato da parte delle IgG.

ABSTRACT

Human Immunoglobulins G (IgG) are increasingly used with beneficial effects in the treatment of a variety of immunological disorders. However, despite the wide therapeutic application, the molecular mechanism by which IgG display their effects is not yet fully elucidated. Several, mutually non-exclusive mechanisms have been proposed that for most part regard effects on cells of immunity, their secretion products and specific IgG receptors. Since IgG are administered by intra venous route and circulate in plasma, the possibility was investigated in this work that IgG can exert their effects on endothelial cells. To this aim, HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) that show properties of cells of the innate immunity were chosen in the experimental design and effects of various concentrations of human IgG, purified from blood of healthy donors, measured on cell morphology and on the expression of a panel of heat shock proteins (HSPs) and of matrix metalloprotease-9 (MMP-9) at different incubation times. IgG caused a dose- and time-dependent angiogenic-like transformation of HUVECs that peaked at 20 h incubation and appeared to be associated with the expression of new forms of HSP90, HSP70 and MMP-9 induced by the activation of the PI3K/Akt pathway, whereas the MEK-ERK1/2 pathways was apparently not involved. Measurement of the expression and activity of the proteins in the cell medium demonstrated the active secretion of a proteolytically inactive form of MMP-9 that was secreted in complexes with the HSPs and was responsible for the induction of morphological changes in HUVECs, provided that the stimulus triggered by IgG was sufficiently intense and prolonged. Measurements of IgG expression in both cell lysates and media performed by means of Western blotting and ELISA, together with the analysis of the gene expression of IgG showed that IgG were able to induce their own expression and secretion from the cell. The “*ex-novo*” synthesis of IgG was triggered by IgG even after they were removed from the incubation medium and replaced with fresh medium without IgG. The process involved the new synthesis of FcRn receptor that was also secreted in association with IgG, a result that proved the participation of FcRn in the cycle of absorbance and secretion of IgG. That the effects of IgG were dependent on their internalization in the cell was also confirmed by immunofluorescence experiments in which IgG were always visualized in the cytoplasm in endocytic vesicles distinct from the cell membrane.

Abstract

The same experiments performed in HUVECs were also conducted on peripheral blood mononuclear cells of three healthy subjects. IgG caused changes in the lymphocyte morphology associated with the stimulation of both the synthesis and the active secretion of IgG; these effects were crucially dependent in their entity on the basal condition of the immune system of each subject.

Results revealed for the first time the capacity of IgG to induce their own synthesis and secretion in a particular type of endothelial cells physiologically not deputed to these functions. This effect, together with the activation of the immune cells, might be of therapeutic value, since it can enhance and prolong the immune response following the intra venous administration of IgG. The mechanism involved in the “*ex-novo*” synthesis of IgG appears to be independent of that responsible for the morphological changes of cells that instead requires a more intense and prolonged activating stimulus by IgG.

INTRODUZIONE

1. IMMUNOGLOBULINE

1.1 Premessa

Le immunoglobuline (Ig) circolano nel plasma e svolgono la funzione di anticorpi solubili prodotti in seguito ad uno specifico stimolo antigenico dai linfociti B attivati, che vengono così trasformati in plasmacellule. Le plasmacellule sono normalmente localizzate all'interno di organi di natura linfoide, come i linfonodi, il midollo osseo e la milza. La produzione di anticorpi in un organismo è continua perché la stimolazione antigenica cui l'organismo è sottoposto da parte dell'ambiente è continua e gli anticorpi che vengono così prodotti sono diversi a seconda della diversità antigenica. Ogni linfocita B produce un solo tipo di anticorpo diretto verso un particolare antigene; quindi, in condizioni di normale stimolazione antigenica da parte dell'ambiente, si ha la produzione di immunoglobuline che vengono definite pre-immuni e la risposta immunitaria è di tipo policlonale in quanto più cloni di linfociti B sono stimolati contemporaneamente. Nei casi invece in cui vi sia una stimolazione intensa da parte di un singolo antigene (come a seguito di infezioni sostenute da agenti batterici e/o virali) vi è la specifica stimolazione di un clone (risposta monoclonale) che produce anticorpi in numero elevato contro un determinato antigene. In questo caso le immunoglobuline sono definite iper-immuni. La risposta immunitaria verso uno o più antigeni è comunque un processo complesso che richiede l'intervento di linfociti diversi attivati in fasi diverse e che varia nella rapidità ed intensità a seconda anche che il contatto con l'antigene sia primitivo o ripetuto nel tempo.

1.2 Struttura generale delle Ig

Dal punto di vista della struttura generale le Ig sono glicoproteine composte per un 90% circa da proteina e per un 10% da carboidrati. Esse presentano una forma definita ad Y perché composta da tre domini globulari di uguali dimensioni, collegati da una porzione flessibile costituita da una catena polipeptidica nota come regione cerniera o *hinge* (Figura 1).

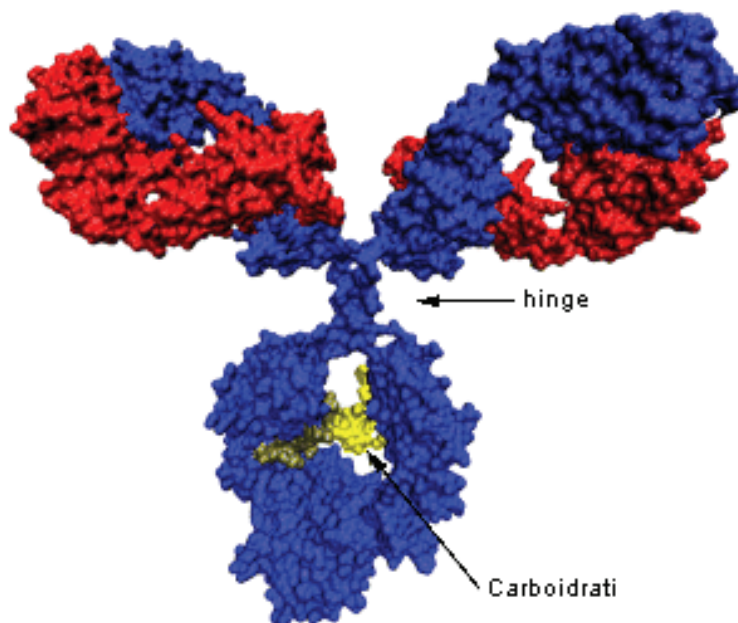


Figura 1. Rappresentazione schematica di una immunoglobulina. Si possono distinguere le tre regioni globulari che complessivamente formano una Y unite da una porzione flessibile nota come regione *hinge*. In blu sono rappresentate le catene pesanti, in rosso quelle leggere e in giallo i carboidrati (immagine modificata da Collin M, 2008)

Nel particolare, la molecola di Ig è costituita da due differenti tipi di catene polipeptidiche: una detta pesante ed una leggera legate fra loro da ponti disolfuro. Questa unità strutturale è ripetuta due volte nella molecola intera dell'Ig in modo che l'unità formata da una catena pesante più una leggera è legata da ponti disolfuro ad un'uguale unità di catena pesante più una leggera. In generale, la catena pesante o H, è costituita da tre o quattro domini proteici e il suo peso è di circa 50 kDa, mentre la catena leggera o L, del peso di circa 25 kDa, è costituita da due domini proteici. Complessivamente quindi, una molecola intera di Ig ha il peso di 150 kDa. Le "braccia" della struttura a Y sono quindi formate dall'associazione delle catene leggere con la porzione ammino-terminale delle catene pesanti, mentre il "tronco" della Y è formato dalle due porzioni carbossi-terminali delle catene pesanti (Figura 2). In ogni molecola di Ig, le due catene pesanti e le due catene leggere sono identiche, ed in ogni catena si può distinguere una regione o dominio detto variabile (V) in corrispondenza della porzione ammino-terminale ed un dominio detto costante (C) di pertinenza della restante parte della molecola. Il dominio variabile delle catene pesanti e delle catene leggere (V_H e V_L , rispettivamente) costituiscono insieme la regione V (regione variabile) dell'anticorpo

che conferisce la capacità di legare uno specifico antigene, mentre i domini costanti delle catene pesanti e leggere (C_H e C_L , rispettivamente) costituiscono la regione detta costante (Figura 2). Ogni molecola di Ig presenta quindi due uguali siti di legame per l'antigene.

I domini delle catene pesanti C_H sono numerati con numerazione progressiva a partire dalla porzione ammino-terminale, (C_{H1} , C_{H2} ,...) e le Ig possono contenere da tre a quattro domini C_H . In generale, l'associazione delle catene pesanti con le leggere è tale che i domini V_H si trovano appaiati con i domini V_L , come pure i domini C_{H1} con i domini C_L e i domini C_{H2} e C_{H3} di una catena con i corrispondenti dell'altra.

Inoltre, tra i domini C_{H1} e C_{H2} di certi isotipi di Ig è presente la regione *hinge*, lunga da 10 a 60 residui amminoacidici, a seconda del diverso isotipo di Ig, che conferisce all'intera molecola una certa flessibilità, grazie alle proprietà strutturali degli amminoacidi che la formano.

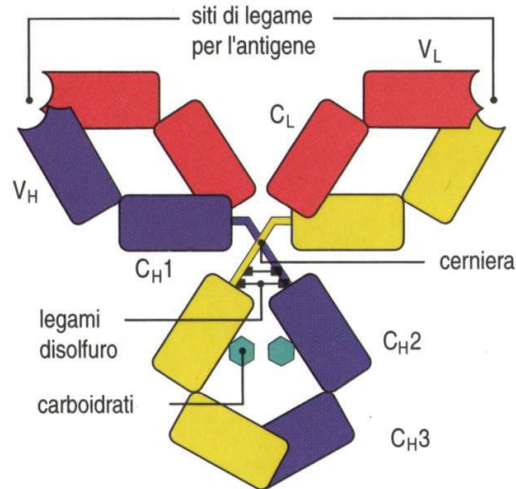


Figura 2. Rappresentazione schematica della struttura di una immunoglobulina. Si possono riconoscere le tre regioni che complessivamente formano una Y. Ogni regione è costituita da quattro domini proteici formati da due catene pesanti (giallo e viola) e due catene leggere (rosso). Le due catene pesanti e le due catene leggere sono fra loro identiche in modo da presentare due siti di legame per l'antigene identici. (immagine modificata da Murphy K, 2010).

1.2.1 Tipologia delle catene che formano una Ig

Sono stati identificati due tipi di catene leggere, denominate lambda (λ) e kappa (κ), ed una Ig può possedere catene leggere λ oppure κ , ma non entrambe. Non sono state trovate differenze funzionali tra anticorpi che possiedono l'uno o l'altro tipo di catena

Introduzione

leggera, ma la proporzione tra i due tipi di catena leggera varia da specie a specie. Per esempio, nei topi il rapporto medio tra catene κ e λ è di 20:1, nei bovini è di 1:20 e nell'uomo di 2:1. Variazioni significative nei rapporti fra catene sono state trovate nei casi di un'anomala proliferazione di uno specifico clone che produce in eccesso la stessa catena, condizione questa che può associarsi a forme patologiche gravi (Murphy K, 2010).

La determinazione delle sequenze amminoacidiche sia delle catene pesanti che di quelle leggere ha permesso di scoprire due importanti caratteristiche degli anticorpi. La prima è che ogni catena, sia pesante che leggera, è caratterizzata da una serie di sequenze simili, ma non identiche, ciascuna lunga circa 110 amminoacidi. Ciascuna di queste sequenze ripetute, ripiegata in modo compatto, corrisponde a una distinta regione della proteina, nota come dominio proteico. Ciascuna catena leggera è composta di due di questi domini proteici (Figura 2, colore rosso), mentre la catena pesante ne contiene quattro (Figura 2, colore giallo e viola). Questo riscontro ha fatto pensare che le catene delle Ig siano evolute grazie alla duplicazione di un singolo gene ancestrale.

La seconda importante caratteristica, rilevata dal confronto delle sequenze amminoacidiche, è la grande variabilità di sequenza presente nella parte ammino-terminale delle catene pesanti e leggere, diversa da anticorpo ad anticorpo. La variabilità della sequenza è comunque limitata ai primi 110 aminoacidi, corrispondenti al primo dominio, mentre gli altri domini sono costanti nelle catene dello stesso isotipo (Murphy K, 2010).

1.2.2 Il sito di legame con l'antigene

Come detto sopra, la zona ammino-terminale di un anticorpo è quella deputata al legame con l'antigene. Le regioni V di un anticorpo sono uniche, ma la variabilità della sequenza non è distribuita uniformemente lungo tutta questa regione, bensì si concentra solo in alcuni tratti detti regioni ipervariabili. In ogni Ig sono presenti tre regioni ipervariabili nel dominio V_H e tre nel dominio V_L . I tratti compresi tra una regione ipervariabile e l'altra e che costituiscono il resto del dominio V, mostrano una ridotta variabilità e sono denominati regioni cornice, presenti in numero di quattro in ciascun dominio V. Mentre le regioni cornice assumono una struttura a foglietti β (β sheet) che complessivamente caratterizzano la struttura dell'intero dominio, le sequenze ipervariabili corrispondenti alle tre anse sulla parte esterna della regione cornice assumono una struttura più disordinata (*random coil*) (Figura 3).

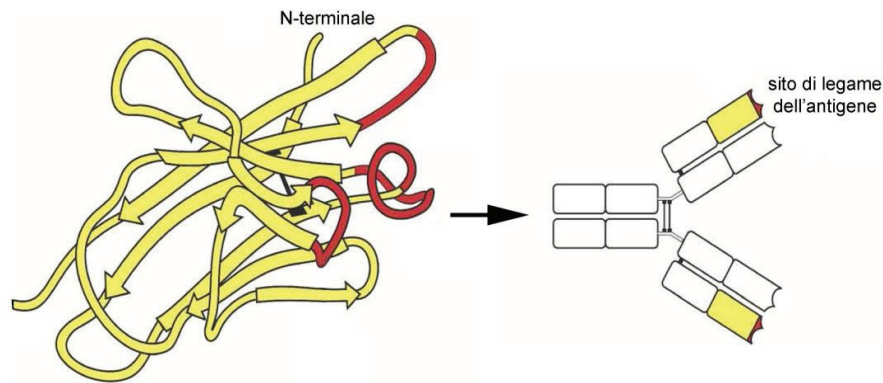


Figura 3. Rappresentazione schematica delle regioni ipervariabili della catena leggera. Le tre regioni ipervariabili della catena leggera, indicate in rosso, sono posizionate nella struttura del dominio V in modo tale che si collocano in anse ravvicinate tra loro dal ripiegamento delle regioni cornice, meno variabili, indicate in giallo. Anche la regione CDR (vedi testo) della catena pesante presenta le stesse caratteristiche (non mostrato). (Immagine modificata da Murphy K, 2010).

Considerando che i domini V_H e V_L sono appaiati nella molecola dell'anticorpo, le regioni ipervariabili dei due domini si trovano vicine, creando così il sito ipervariabile all'estremità ammino-terminale di ciascun braccio della Y (Figura 3). Questo sito è specificamente deputato a legare l'antigene formando una superficie ad esso complementare denominata regione di complementarità (CDR o *complementarity determining region*). Il contatto con l'antigene avviene tramite legami con gli amminoacidi presenti all'interno del CDR, anche se la natura del legame dipende dalla forma e dimensioni dell'antigene (Murphy K, 2010).

1.3 Caratteristiche delle subunità delle Ig

L'uso di proteasi, enzimi proteolitici che rompono i legami peptidici, ha permesso di scomporre la struttura dell'anticorpo e chiarire quali parti della molecola sono responsabili delle diverse funzioni. Nello specifico, si usano due enzimi appartenenti alla classe delle idrolasi: la papaina e la pepsina. La papaina scinde la catena peptidica al di sopra del primo dei due ponti disolfuro che si trovano nella regione cerniera e legano fra loro le due catene pesanti in corrispondenza dei domini C_{H1} e C_{H2} (Figura 4). La scissione produce tre frammenti della molecola di anticorpo: due frammenti sono identici e contengono il sito di riconoscimento antigenico, e sono i frammenti Fab (*Fragment antigen binding*) costituiti da un'intera catena leggera accoppiata ai domini

Introduzione

V_H e C_{H1} delle catene pesanti; l'altro frammento, che cristallizza in modo molto rapido e per questo motivo è stato chiamato Fc, frammento cristallizzabile (*Fragment crystallizable*), corrisponde ai domini C_{H2} e C_{H3} accoppiati. Questa è la parte di anticorpo che è responsabile della funzione effettrice e interagisce con le cellule dell'immunità. Le differenze funzionali tra i diversi isotipi delle Ig risiedono principalmente nel frammento Fc.

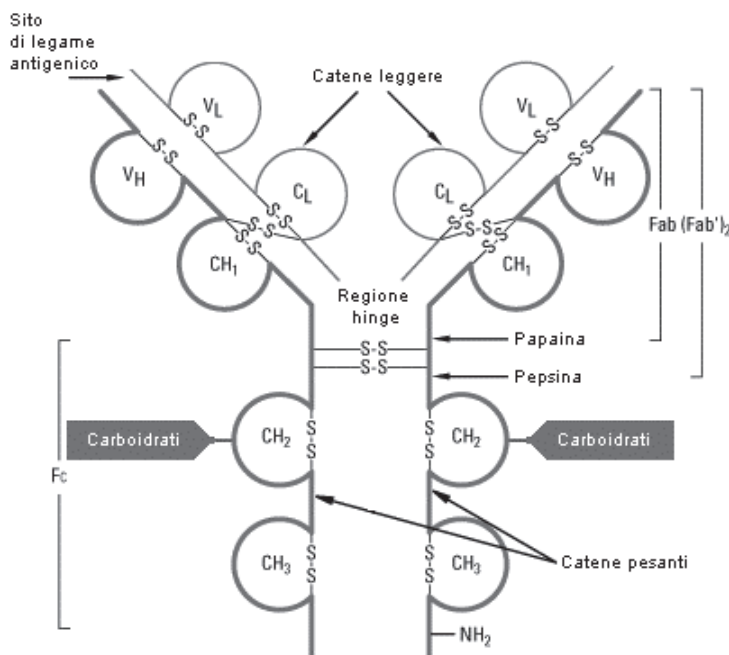


Figura 4. Schema della struttura della molecola di Ig con indicati i punti di attacco della digestione proteolitica da parte della papaina e della pepsina. La prima genera i due frammenti Fab ed il frammento Fc intero mentre la seconda taglia la molecola di Ig in modo da produrre il frammento $F(ab')_2$ e le catene singole della porzione Fc.

La pepsina invece taglia la molecola di anticorpo al di sotto del ponte disolfuro che lega fra loro le catene pesanti in corrispondenza delle porzioni C_H successive alla C_{H1} , producendo in tal modo un frammento chiamato $F(ab')_2$, in cui rimangono legati tra loro i due Fab. Il frammento $F(ab')_2$ ha esattamente le stesse proprietà della molecola intera per quanto riguarda il legame antigene-anticorpo ma non è in grado di svolgere funzioni effettrici in quanto privo della porzione Fc. La porzione restante della catena pesante viene digerita in modo da ottenere le singole catene dell'Fc, del peso di 25 kDa ciascuna, e prolungando la digestione enzimatica queste catene vengono tagliate fino ad ottenere dei piccoli frammenti (Murphy K, 2010).

1.4 Isotipi delle Ig

Le classi degli anticorpi e le loro proprietà funzionali distintive sono definite dalla struttura della regione carbossi-terminale della catena pesante. Esistono cinque principali isotipi di Ig definiti dalle lettere alfabetiche A, D, E, G ed M, ed alcuni isotipi sono a loro volta caratterizzati da diversi sottotipi. Nell'ambito del singolo isotipo, le catene pesanti sono indicate da una lettera dell'alfabeto greco; così, le lettere γ , μ , δ , α ed ϵ indicano le catene pesanti presenti nell'isotipo IgG, IgM, IgD, IgA ed IgE, rispettivamente (Murphy K, 2010).

	IgA	IgD	IgE	IgG	IgM
Complesso molecolare	Dimero	Monomero	Monomero	Monomero	Pentamero
Peso Molecolare (kDa)	160-400	180	150	150	950-1150
Numero di sottotipi	2	1	1	4	1
Concentrazione plasmatica (mg/ml)	0.8 – 4.0	0.04 – 1.5	$3 - 5 \times 10^{-5}$	6.0 – 16.0	0.4 – 2.4
Trasferimento placentare	No	No	No	Si	No

Tabella 1. Alcune delle proprietà caratteristiche dei cinque isotipi delle Ig umane. (Immagine modificata da Murphy K, 2010).

Altre differenze tra i diversi isotipi di Ig riguardano il numero e la posizione dei legami disolfuro intercatena, il numero di residui oligosaccaridici attaccati, il numero dei domini C_H e la lunghezza della regione cerniera. Le IgM e le IgE, per esempio, contengono un dominio C_H in più rispetto alle altre Ig che va a sostituire la regione *hinge*. La mancanza della regione *hinge*, comunque, non influenza negativamente la flessibilità dell'intera molecola; infatti, immagini al microscopio elettronico di molecole IgM legate all'antigene hanno mostrato come le regioni Fab possano flettersi comunque sulla porzione Fc (Murphy K, 2010). Nella Tabella 1 sono riportate alcune delle caratteristiche distintive di ciascuna classe di Ig.

1.4.1 IgA

Le IgA costituiscono circa il 20% delle Ig circolanti e sono il principale isotipo presente nelle secrezioni delle mucose del tratto intestinale, delle vie respiratorie, saliva, lacrime e latte materno. Nel siero si presentano sotto forma di monomeri, mentre nelle secrezioni sono in forma di dimeri. La dimerizzazione avviene grazie ad un residuo di cisteina, presente nella coda di 18 amminoacidi che fuoriesce da ciascuna regione C_H3, e ad una catena, detta peptide J, del peso di circa 15 kDa, che catalizza la reazione di polimerizzazione tramite la formazione di ponti disolfuro con il residuo di cisteina (Figura 5).

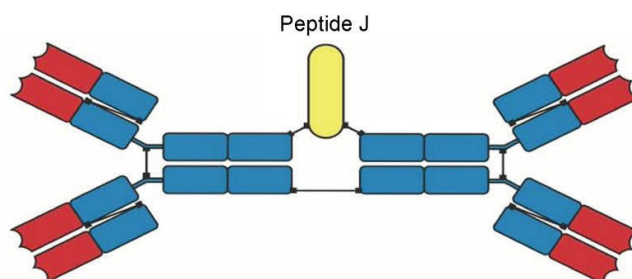


Figura 5. Rappresentazione schematica della struttura dell'IgA nella forma di dimerico. I monomeri di IgA sono legati al peptide J e tra di loro da ponti disolfuro. Il peptide J, struttura indipendente di circa 15 kDa, può catalizzare la formazione del dimerico grazie alla presenza in entrambi i monomeri di una cisteina libera in grado di formare un legame disolfuro anche fra le catene pesanti (immagine modificata da Murphy K, 2010).

Le plasmacellule che secernano IgA si trovano prevalentemente nella lamina propria (localizzata immediatamente sotto la membrana basolaterale) di molti epitelii, come l'epitelio intestinale, bronchiale, della ghiandola mammaria, delle ghiandole salivari e lacrimali. Una volta che le IgA sono sintetizzate nella lamina propria e secrete come dimeri, ai quali è associato il peptide J, per attraversare la cellula epiteliale ed arrivare sulla superficie esterna devono legarsi in modo specifico ad un recettore denominato recettore polimerico dell'Ig (recettore poli-Ig) espresso sulla membrana basolaterale delle cellule epiteliali. Questo recettore ha un'affinità elevata per le Ig polimeriche legate al peptide J. Dopo il legame, il complesso, formato da recettore poli-Ig e IgA dimerica, va incontro alla transitosi, con la quale viene trasportato in una vescicola attraverso la cellula fino alla superficie apicale. A questo punto l'Ig è rilasciata nelle secrezioni del lume per scissione proteolitica del dominio extracellulare del recettore

poli-Ig. Una parte del recettore che è stato scisso resta associata all'IgA ed è conosciuta come componente secretoria, da cui il nome IgA secretoria. Questa componente secretoria ha anche una funzione particolare in quanto i carboidrati presenti in essa si legano al muco e trattengono l'IgA alla superficie epiteliale. Il pezzo residuo del recettore poli-Ig rimasto adeso alla membrana non è più funzionale e viene degradato.

Le IgA sono una componente importante per la difesa di prima linea contro i microrganismi che entrano attraverso le mucose, prevenendone l'attacco alla superficie delle cellule epiteliali o neutralizzandone le tossine (Murphy K, 2010).

1.4.2 IgD

Le IgD rappresentano circa lo 0.25% delle Ig totali. Sono normalmente espresse sulla superficie dei linfociti B immaturi assieme alle IgM (Vladutiu AO, 2000; Murphy K, 2010), per cui è stato ipotizzato che la loro unica funzione sia quella di agire da recettori cellulari di superficie nei confronti degli antigeni favorendo il differenziamento del linfocita B immaturo in plasmacellula. Le IgD presentano due differenze strutturali rispetto alle altre Ig: 1) una lunga regione *hinge* particolarmente suscettibile alla degradazione proteolitica; 2) una sequenza di 26 amminoacidi idrofobici a livello della porzione C-terminale delle catene pesanti. Pare che questa sequenza sia responsabile dell'inserimento dell'Ig nel doppio strato fosfolipidico della membrana plasmatica permettendole così di restare ancorata alla superficie del linfocita B immaturo. Questa funzione peculiare giustifica l'esclusivo riscontro delle IgD nella forma monometrica come pure il fatto che siano scarsamente presenti in circolo (Abbas AK, 2002).

1.4.3 IgE

Le IgE sono un tipo di Ig presenti solo nell'uomo. Sono prodotte dai linfociti B localizzati principalmente nella tonaca sottomucosa del tratto respiratorio e intestinale, e costituiscono una seconda barriera alle infezioni dopo le IgA. La produzione delle IgE è stimolata da una sottopopolazione di linfociti T *helper* (T_H), i linfociti T_{H2} , attivati a loro volta dagli allergeni che entrano nell'organismo. L'attivazione dei linfociti T_{H2} porta alla liberazione di una serie di mediatori peptidici, come l'interleuchina-4 (IL-4) e IL-5, responsabili della trasformazione dei linfociti B in plasmacellule. Le IgE, secrete dalle plasmacellule, si legano con la loro porzione Fc al loro specifico recettore, il recettore FcεR, che si trova su mastociti e basofili. Questo recettore è un eterodimero altamente glicosilato, che contiene una catena α , una catena β e due catene γ . La catena

Introduzione

α è quella responsabile dell'associazione con le IgE monomeriche che si legano con un'affinità molto elevata (costante di dissociazione K_d di 10^{-10} M) (Nezlin R, 2004). Una volta che l'antigene si lega alle IgE sulle cellule, il complesso antigene-anticorpo scatena la degranulazione del mastocita liberando nello spazio intercellulare istamina, mediatori lipidici, prostaglandine, leucotrieni e trombossani responsabili della reazione allergica (Abbas AK, 2002).

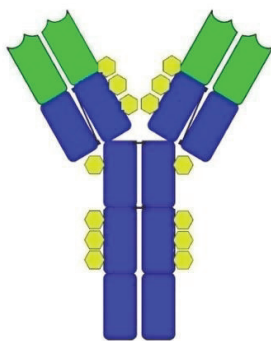


Figura 6. Rappresentazione schematica della molecola di IgE. Nella catena pesante sono presenti quattro domini C_H (blu) a differenza delle IgA, IgD e IgG che ne hanno tre. In verde sono rappresentati i domini variabili delle catene leggere e pesanti e in giallo è indicata la distribuzione dei gruppi di carboidrati. (immagine modificata da Murphy K, 2010).

Dal punto di vista strutturale le IgE si differenziano dagli altri sottotipi di Ig, in quanto possiedono quattro domini C_H (Figura 6), analogamente alle IgM e, come per le IgM, il dominio aggiuntivo sostituisce la regione cerniera senza perdita di flessibilità (Murphy K, 2010).

1.4.4 IgG

Le IgG rappresentano approssimativamente il 75% delle immunoglobuline seriche nell'uomo, risultando così il più abbondante isotipo anticorpale in circolazione. La catena pesante delle immunoglobuline G può essere prodotta in quattro sottotipi diversi, e così si distinguono le sottofamiglie IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Le IgG sono gli anticorpi più impiegati durante la risposta immunitaria secondaria, non solo perché sono prodotte tardivamente, circa 4-5 giorni dopo l'inizio dell'infiammazione, ma soprattutto perché sono secrete in modo massivo dalle plasmacellule. Le IgG sono potentissime opsonine, infatti, sono in grado di legarsi ai microbi con grande efficienza in modo da

permetterne la fagocitosi da parte dei macrofagi. A questo scopo, svolgono un ruolo importante nell'attivazione della via classica del complemento, complesso di proteine del plasma che sono attivate in una serie di reazioni a cascata dalla presenza dei patogeni (Murphy K, 2010).

Le IgG sono l'unico isotipo di Ig in grado di attraversare la barriera placentare, svolgendo quindi l'importante funzione di protezione del feto durante i primi mesi di vita quando non è ancora in grado di produrre anticorpi da solo. È stato osservato che nell'ambito delle IgG, il sottotipo IgG1 è quello più concentrato nel sangue del cordone ombelicale (circa del 60% più alto che nel siero materno) a dimostrazione di un efficiente trasporto attivo. Dopo la nascita, la madre continua a trasferire le IgG al neonato mediante l'allattamento: il latte materno contiene, infatti, elevate concentrazioni di IgG e IgA, che passano nell'apparato digerente del neonato. Grazie a questo passaggio un neonato ha inizialmente livelli anticorpali paragonabili a quelli della madre. A livello dell'apparato digerente, mentre le IgA non sono assorbite, ma svolgono un ruolo protettivo verso i batteri, le IgG sono assorbite a livello dell'epitelio intestinale mediante uno specifico recettore, denominato recettore neonatale e immesse nel torrente circolatorio (Abbas AK, 2002).

1.4.5 IgM

Le IgM sono i primi anticorpi prodotti dalle plasmacellule in risposta all'iniziale esposizione all'antigene. Le IgM esistono in due conformazioni: 1) monomeriche, e in questa forma rimangono ancorate sulla superficie dei linfociti B per la presenza di una catena di 26 amminoacidi idrofobici nella porzione C terminale, fungendo così da recettore per l'antigene; 2) pentamerica, ossia come complesso di cinque monomeri legati assieme da ponti disolfuro in corrispondenza del C-terminale. Questa forma pentamerica viene stabilizzata dalla presenza del peptide J che rimane legato alla sequenza terminale per mezzo di ponti disolfuro (Klimovich VB, 2011; Murphy K, 2010). La funzione principale delle IgM è di innescare la via classica di attivazione del complemento favorendo il processo di opsonizzazione (Abbas AK, 2002).

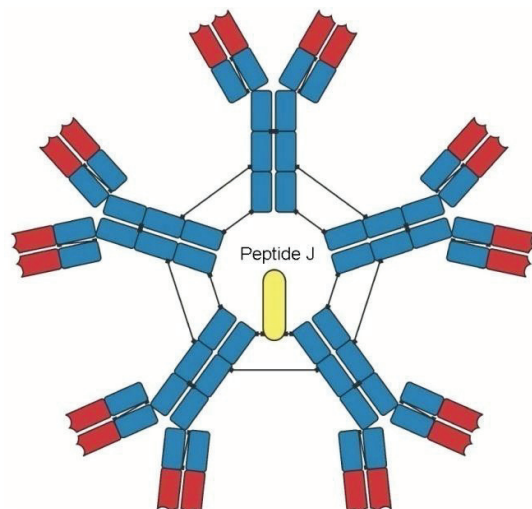


Figura 7. Rappresentazione schematica di una IgM nella forma pentamerica. Per la formazione della struttura pentamerica sono necessarie due cisteine. La prima cisteina, altamente conservata, è localizzata in una coda di 18 amminoacidi che parte dal dominio C_H4 e catalizza la reazione di polimerizzazione tra i domini C_H4 degli altri monomeri e tra i monomeri e il peptide J. La seconda cisteina è localizzata nel dominio C_H3 , ed è responsabile dell'assemblamento della struttura pentamerica. Tutti i ponti disolfuro e il peptide J servono a mantenere la struttura stabile (Klimovich VB, 2011). (Immagine modificata da Murphy K, 2010).

1.5 Sintesi delle Ig

A metà del secolo scorso le informazioni sulla sintesi degli anticorpi erano piuttosto limitate; si sapeva che la molecola di Ig comprendeva una regione V (variabile) altamente diversificata che conferiva la specificità per il legame all'antigene e una regione C (costante). Sulla base di questi dati si formulò la prima ipotesi (teoria germinale) sull'organizzazione dei geni che codificano per le Ig. Secondo questa teoria un solo gene era responsabile della codifica di una sola proteina e il repertorio anticorpale era per la maggior parte ereditato. Fu presto chiara l'incongruenza di questa teoria che, basandosi sul presupposto che le regioni V e C costituivano una sola catena polipeptidica, non riusciva a spiegare come mai la sola regione variabile andasse incontro ad estese mutazioni. Nel 1965 Dreyer e Bennett (Dreyer WJ, 1965) postularono la teoria della diversificazione somatica, secondo la quale ogni catena anticorpale è codificata da almeno due geni diversi, uno per la regione V e l'altro per la regione C che si uniscono a livello del DNA o dell'RNA messaggero per formare proteine anticorpali complete. La validità di questa ipotesi è stata confermata nel 1976 da Susumu Tonegawa (Hozumi N, 1976) ed ha permesso di stabilire che durante la

maturazione dei linfociti B vi è un processo di riarrangiamento del genoma, detto riarrangiamento genico, determinato dal fatto che le regioni variabili della Ig sono codificate da due o tre tipi di segmenti genici, ognuno dei quali esiste in più copie nel genoma germinale. Durante il riarrangiamento la selezione di un segmento genico avviene casualmente in modo tale che si genera un numero elevatissimo di possibili combinazioni responsabili della variabilità della regione di legame all'antigene (Abbas AK, 2002; Murphy K, 2010).

1.5.1 Organizzazione dei geni delle Ig

L'organizzazione dei geni delle Ig nella linea germinativa è molto simile nella maggior parte delle specie. Nell'uomo i geni che codificano per le due catene leggere, κ e λ , sono situati in due cromosomi diversi, rispettivamente, 2 e 22, mentre il locus per la catena pesante si trova nel cromosoma 14.

I loci delle catene leggere e pesanti delle Ig sono composti da numerosi geni che codificano per le regioni V e C, separati da tratti di DNA non codificante, gli introni. Nel DNA non riarrangiato, i segmenti genici che codificano per la regione V sono localizzati lontano dalla regione C. Il meccanismo di riarrangiamento del DNA per i loci delle catene pesanti e leggere è simile, anche se per creare il gene della catena leggera è necessario un solo evento di riarrangiamento genico, mentre ne servono due per il gene della catena pesante.

Il dominio V della catena leggera di una Ig è codificato da due segmenti separati di DNA, uno chiamato segmento variabile o segmento genico V_L e l'altro chiamato segmento di legame o segmento genico J_L . L'unione dei segmenti genici V e J crea un esone che codifica per l'intera regione V della catena leggera. Il dominio C della catena leggera è codificato da un esone separato, localizzato vicino ai segmenti genici J della porzione variabile (Figura 8, pannello a sinistra). Durante la maturazione dell'RNA messaggero vi è la rimozione di tutti gli introni ed in questo modo le regioni V, J e C vengono unite e ci può essere la formazione della catena polipeptidica che porta alla formazione della catena leggera della Ig. Come detto sopra, i segmenti genici V, J e C esistono in più copie nel DNA germinale, in questo modo si possono creare numerose combinazioni nella formazione di una molecola di Ig.

Anche il dominio V della catena pesante è codificato da tre segmenti genici diversi, i segmenti V_H e J_H (indicati con la H per distinguerli da quelli delle catene leggere), e un

Introduzione

terzo segmento genico D_H , o della diversità, che si trova localizzato fra i segmenti V_H e J_H .

L'unione dei segmenti genici V, D e J crea un esone che codifica per l'intera regione V della catena pesante. Anche il dominio C della catena pesante è codificato da un esone separato, localizzato vicino ai segmenti J. L'esone per il dominio C contiene una serie di sequenze allineate una dopo l'altra, ciascuna corrispondente ad un diverso isotipo di Ig (Figura 8, pannello a destra). Durante la maturazione dell'RNA messaggero vi è la rimozione di tutti gli introni ed in questo modo le regioni V, D, J e C vengono unite e ci può essere la formazione della catena polipeptidica che porta alla formazione della catena pesante della Ig. Anche la catena pesante, come la catena leggera, è presente in più copie nel DNA germinale, fornendo così una grande variabilità alla formazione delle molecole di Ig (Murphy K, 2010).

Inizialmente le cellule B esprimono gli isotipi μ e δ della catena pesante che, attraverso un meccanismo di *splicing* alternativo dell'RNA messaggero, generano immunoglobuline IgM e IgD. L'espressione degli altri isotipi, come per esempio l'isotipo γ , che dà origine alle IgG, avviene successivamente attraverso riarrangiamenti del DNA denominati scambio di classe. La ricombinazione con scambio di classe coinvolge solo la porzione C e questo evento porta alla sostituzione della regione C originale della catena pesante con una regione C alternativa, aumentando così la diversità funzionale del repertorio immunologico (Xu Z, 2012; Chaudhuri J, 2004). Durante il processo di riarrangiamento genico è possibile ottenere una grande variabilità di regioni V_L in quanto il riarrangiamento genera sia una diversità combinatoria che giunzionale. La prima consiste nella potenziale utilizzazione di diverse combinazioni dei vari segmenti genici, la seconda avviene per aggiunta o sottrazione di nucleotidi durante la ricombinazione.

I due meccanismi danno origine a un vasto repertorio anticorpale che si calcola possa raggiungere nell'uomo il numero di circa 10^{11} . Inoltre, ad aumentare la variabilità nella capacità di legare l'antigene interviene anche il meccanismo di ipermutazione somatica, che introduce mutazioni puntiformi nei geni riarrangiati delle regioni V delle cellule B attivate (Murphy K, 2010).

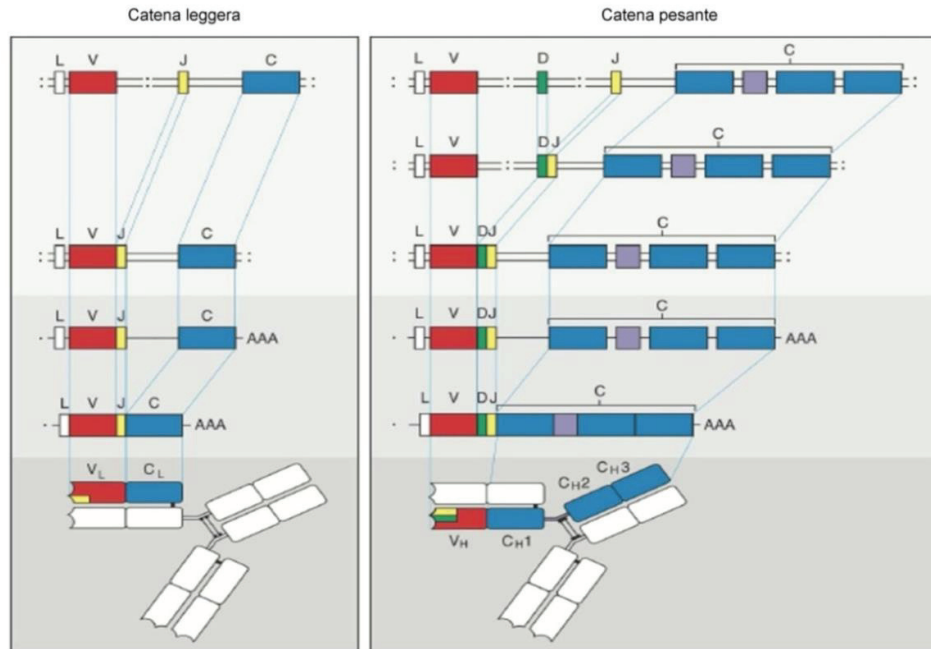


Figura 8. Fasi del riarrangiamento genetico nel processo di codifica dell'intera catena leggera e pesante di una Ig. I geni della regione variabile V della catena leggera (pannello a sinistra) sono formati da un segmento V e un segmento J. Questi due segmenti sono congiunti nel DNA genomico in modo da formare l'esone completo. Siccome le Ig sono proteine extracellulari, il segmento V è preceduto da un esone che codifica il peptide L, *leader*, che dirige la proteina lungo la via di secrezione. Successivamente, il peptide L sarà rimosso. La regione C della catena leggera è codificata da un esone separato e la rimozione degli introni fra L e V e fra J e C avviene durante la maturazione dell'RNA messaggero. Le regioni variabili V delle catene pesanti (pannello a destra) sono formate partendo da tre segmenti genici, V, D e J, mentre la regione C della catena pesante può essere codificata da molti esoni. Anche in questo caso è presente il peptide guida L, che verrà eliminato dopo la traduzione, quando si formano i legami disolfuro fra le catene. Nello schema, le regioni V sono indicate in rosso, quelle costanti in blu, mentre la regione *hinge* è colorata in viola (Immagine modificata da Murphy K, 2010).

1.6 La glicosilazione delle Ig

Un'importante modificazione post-trascrizionale delle Ig è la glicosilazione, processo che ha una serie di conseguenze sulle proprietà strutturali e funzionali delle Ig. La formazione della struttura oligosaccaridica avviene a livello del lume del reticolo endoplasmatico, dove, per quanto riguarda le IgG, è stata documentata la sintesi di 14 monosaccaridi trasferiti sull'Asn297, un sito conservato di glicosilazione su ogni C_{H2} con l'aiuto dell'enzima oligosaccariltransferasi. In seguito le catene leggere e pesanti delle IgG sono assemblate assieme e la molecola intera di IgG è trasportata al Golgi, dove subisce ulteriori modificazioni che nella fase finale prevedono l'aggiunta di un galattosio e di un acido sialico per opera di enzimi specifici (Figura 9) (Anthony RM,

Introduzione

2012). Sono stati identificati oltre 30 tipi diversi di glicani che possono essere legati al dominio Fc delle IgG in individui sani. Si calcola anche che approssimativamente il 20% dei domini Fab delle IgG possano essere glicosilati durante il processo di ipermutazione somatica (Anthony RM, 2012).

I residui oligosaccaridici possono legarsi in modo covalente all'azoto dell'asparagina (N-glicosilazione) o all'ossigeno dei residui di serina o treonina (O-glicosilazione). Le Ig contengono un numero conservato di siti di N-glicosilazione, sia sulla porzione Fc che sulla catena pesante della porzione Fab, mentre la catena leggera della porzione Fab non contiene siti conservati di glicosilazione, ma la loro presenza nell'intera regione Fab può influenzare in modo significativo il legame all'antigene mediante modificazioni steriche della regione. Inoltre, siti di N- e O-glicosilazione possono essere presenti anche nella regione *hinge* (Arnold JN, 2007). Esiste una notevole diversità fra le Ig sia nella posizione che nel numero dei siti conservati di N- o O-glicosilazione situati sia nella porzione Fc che Fab (Jefferis R, 2009).

È stato documentato che la presenza dei glicani nella regione Fc è indispensabile per il legame delle Ig a tutti i recettori così detti FcγR (paragrafo 2.2.1) localizzati sulla superficie dei leucociti; pare, infatti, che la presenza del glicano permetta di mantenere in una conformazione aperta le catene pesanti della regione Fc in modo che possano prendere contatto con il recettore. La sua assenza invece mantiene in una conformazione chiusa le due catene pesanti impedendo la formazione di una tasca utile per il legame con il recettore specifico (Arnold JN, 2007).

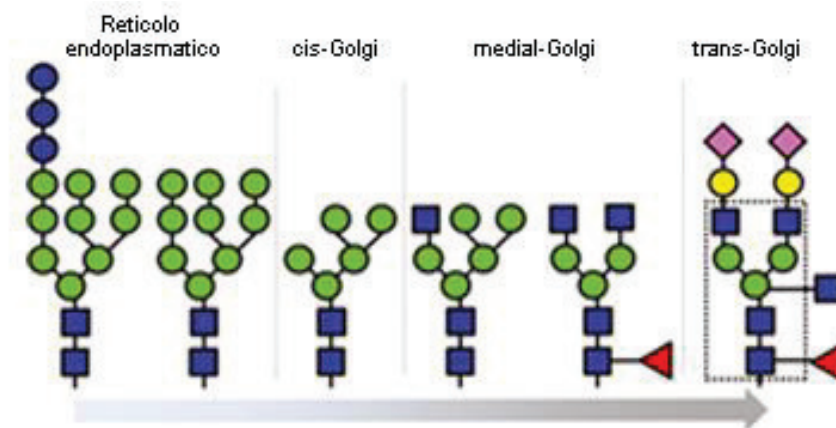


Figura 9. Processo di formazione e composizione del glicano che più frequentemente si trova legato alla Asn297 nella regione Fc delle IgG. Glucosio (cerchi blu), mannosio (cerchi verdi), N-acetilglucosammina (quadrati blu), fucosio (triangoli rossi), galattosio (cerchi gialli) e acido sialico (rombi rosa). (Immagine modificata da Anthony RM, 2012).

Le IgG, come detto sopra, possiedono un sito di N-glicosilazione conservato a livello dell'amminoacido Asn297 in ogni dominio C_{H2} della porzione Fc. L'oligosaccaride presente è costituito da un eptasaccaride altamente ordinato e da catene di N-acetilglucosamina, galattosio, fucosio e acido sialico. Quest'ultimo è normalmente presente in una percentuale ridotta (meno del 10% delle strutture è mono- o di-sialilata) (Jefferis R, 2009).

Le IgE sono le Ig più abbondantemente glicosilate e possono presentare 7 diversi siti di N-glicosilazione nella catena pesante (Figura 6) cui sono legati oligomannosi e anche glicani più complessi dal punto di vista strutturale. Come detto precedentemente (paragrafo 1.4.3), le IgE presentano al posto della regione *hinge* un ulteriore dominio C_H che diminuisce la mobilità della molecola; la presenza della N-glicosilazione al dominio C_{H1} riduce ulteriormente la flessibilità della IgE specialmente della porzione Fab, in quanto l'oligosaccaride forma una struttura *tripod* ("treppiede") attorno al C-terminale della catena leggera. Tutte queste modificazioni strutturali sono funzionali alla stabilità del legame con gli antigeni (Arnold JN, 2007).

Le IgA contengono due siti conservati di N-glicosilazione in ogni catena pesante, il primo nel dominio C_{H2} e il secondo a livello della coda che parte dal C-terminale (paragrafo 1.4.4). Il 30% delle IgA seriche contiene siti di N-glicosilazione localizzati nella regione variabile Fab (Arnold JN, 2007). Dei nove possibili siti di glicosilazione presenti nella regione *hinge*, fino a sei possono essere O-glicosilati (Novak J, 2012). Grazie alla O-glicosilazione le IgA riescono a espletare la loro funzione protettiva soprattutto nei confronti dei microrganismi del tratto intestinale (Arnold JN, 2007).

La glicosilazione delle Ig contribuisce al mantenimento della loro struttura quaternaria, alla stabilità e solubilità della molecola. Influisce inoltre sul legame delle Ig al recettore, sul loro trasporto intracellulare, sulla *clearance*, sull'espansione del repertorio degli anticorpi e nel *cross-talk* tra le vie di risposta immunitaria innata e adattativa. La glicosilazione influenza in modo notevole la suscettibilità delle IgG alla proteolisi e la sua propensione a formare aggregati *in vitro*. La rimozione della struttura oligosaccaridica altera la stabilità del dominio Fc, la sua abilità a legare il recettore FcγR e provoca un aumento della capacità di legame tra le Ig stesse, determinando la formazione di complessi non immuni (vedi oltre, paragrafo 2.1.1) (Arnold JN, 2004). Studi condotti su IgG1 mutate non glicosilate hanno mostrato che la proteina era più sensibile alla digestione enzimatica da parte degli enzimi tripsina e chimotripsina rispetto alle loro omologhe glicosilate, mentre conferiva maggiore resistenza all'azione

Introduzione

della papaina (Raju T, 2006). La maggiore resistenza alla proteolisi conferita alle Ig dalla glicosilazione (Raju T, 2007) può essere spiegata dal mascheramento dei siti di digestione proteolitica da parte delle strutture polisaccaridiche. Inoltre, è stato evidenziato come la stabilità termica degli anticorpi interi e dei frammenti dell'anticorpo diminuisce quando la glicosilazione è rimossa, con conseguente destrutturazione del dominio C_H2 cui è legato il glicano (Liu H, 2006; Mimura Y, 2000). Tuttavia, non è ancora chiaro come il basso grado di stabilità mostrato dalle molecole non glicosilate *in vitro* possa influire sulla loro funzionalità *in vivo* (Jung ST, 2011).

Alterazioni nella quantità e qualità della glicosilazione delle molecole di Ig sono state spesso trovate in associazione a specifiche malattie. Per esempio, modificazioni della glicosilazione delle IgG si sono rilevate nell'artrite reumatoide, in cui è stato riscontrato un marcato aumento delle IgG seriche prive dell'acido sialico e del residuo del galattosio. Nella miastenia grave, malattia in cui si è rilevata una diminuzione del galattosio, e nel cancro ovarico in cui è stato riscontrato un incremento dei residui di mannosio (Arnold JN, 2007). Inoltre, è stato visto che l'aggiunta di un residuo di fucosio alla prima N-acetilglucosamina, posta nel cuore del carboidrato delle IgG, modifica la conformazione della regione Fc diminuendo la sua capacità di legare il recettore FcγRIIIa (paragrafo 2.2.1), recettore espresso sulle cellule *natural killer* responsabili di iniziare la risposta immunitaria. L'aggiunta di un acido sialico invece alla fine del glicano modifica la funzione delle IgG conferendo alla molecola proprietà anti-infiammatorie (Gornik O, 2012).

Anche nelle IgA modificazioni della glicosilazione possono essere associate a condizioni patologiche, per esempio la diminuzione dei residui di galattosio in corrispondenza dei siti di O-glicosilazione sono state osservate nella nefropatia da IgA (Arnold JN, 2007).

2. FARMACODINAMICA DELLE Ig

Le Ig possono interagire diversamente, sia con la porzione Fab che Fc, con proteine circolanti come pure con proteine di struttura (recettori), formando complessi sia di natura immune che non-immune, di significato fisiologico come pure patologico. Verranno qui di seguito considerati alcuni esempi (più comuni e funzionali allo scopo della tesi) di interazioni stabilite dalle Ig con altre proteine.

2.1 Interazioni delle Ig con proteine circolanti

2.1.1 I complessi non-immuni

I complessi non-immuni (CNI) si formano dalle interazioni prevalentemente non covalenti delle Ig con diverse proteine circolanti, incluse le stesse Ig che possono circolare in complessi di varie dimensioni (dimeri o aggregati più grossi). I siti generalmente coinvolti nel legame sono localizzati nel dominio costante, specialmente nel dominio C_{H1}, anche se talvolta possono essere coinvolti i domini C_{H2} e C_{H3} (Nezlin R, 2009) fra i quali si forma una cavità che può offrire altri siti di interazione con le proteine (Nezlin R, 2004). Nel corso degli anni sono stati identificati nel sangue di soggetti sani, come pure in condizioni patologiche, diversi CNI fra cui quelli che si possono formare fra Ig e proteine batteriche e/o virali.

Nel particolare, le proteine circolanti che più spesso sono state identificate nella formazione di CNI sono l'albumina e la fibronectina. Si è visto che nella formazione dei complessi macromolecolari con albumina la classe più frequentemente coinvolta di Ig è quella delle IgG, mentre con la fibronectina sembra che tutte le classi di Ig possano essere coinvolte (Nezlin R, 2004). Nel caso specifico di CNI con proteine batteriche, si possono ricordare le interazioni delle IgG con la Proteina A dello *Stafilococcus aureus* e con la Proteina G e H dello *Streptococcus*. Sia la proteina A che le Proteina G e H reagiscono con l'Fc delle IgG a livello delle dei domini C_{H2} e C_{H3} con elevata affinità. Fra le proteine virali che interagiscono con le Ig, ci sono quelle dell'Herpes Simplex e la proteina gp120 dell'involucro del virus dell'HIV (Nezlin R, 2004). In quest'ultimo caso, pare che il legame che si stabilisce con le Ig avvenga a livello della porzione Fab, preferibilmente nella regione V_{H3}. Non tutte le regioni V_{H3} delle Ig sono comunque in grado di interagire con la proteina gp120 con uguale affinità; pare, infatti, che solo i monomeri delle IgM abbiano un'elevata affinità di legame, mentre il legame con la regione V_{H3} delle IgG è significativamente più basso (Nezlin R, 2004).

Un caso particolare di CNI è costituito dal CD4, una glicoproteina che funge da recettore di membrana per i linfociti T *helper*, che si lega alla porzione Fab delle IgG formando comunque un CNI con le Ig.

Particolare rilievo fisiopatologico hanno alcuni CNI che si formano fra le IgG e alcune *Heat Shock Proteins* (HSPs) che vengono liberate nello spazio extra-cellulare a seguito di fenomeni di alterazione di permeabilità della membrana cellulare e/o di necrosi cellulare in malattie autoimmuni (Pagetta A, 2007, Tramentozzi E, 2008). Questi CNI, a

differenza di altri identificati in condizioni fisiologiche, presentano la caratteristica di avere un legame stabile fra IgG e HSPs così che questi complessi possono comportarsi da immunogeni e la loro persistenza in circolo si associa quindi ad un aumentato rischio di reazioni immunitarie (Tramontozzi E, 2011).

2.1.2 I complessi immuni

I complessi immuni (CI) sono formati dall'associazione tra un qualsiasi tipo di antigene e la porzione Fab dell'Ig, localizzata nel dominio V, attraverso interazioni non covalenti che caratterizzano il legame antigene-anticorpo. A metà del secolo scorso gli esperimenti sulla formazione di precipitati immuni, mostrarono che in presenza di un eccesso di antigene o di anticorpo si formano principalmente CI piccoli e solubili, mentre vicino al punto di equivalenza, cioè alla corretta concentrazione dell'antigene e dell'anticorpo, il *cross-linking* è massimo con formazione di CI grandi e insolubili. In condizioni normali i CI sono rimossi velocemente dalla circolazione, ma in condizioni patologiche la loro deposizione a livello endoteliale, specialmente nel rene, può indurre una condizione di infiammazione cronica. Complessi di questo tipo sono stati trovati in associazione con malattie autoimmuni come la LSE (lupus sistemico eritematoso) (Nezlin R, 2000). CI sono stati trovati nel plasma dei soggetti con diabete di tipo 1; in questo caso si è visto che non solo le IgG intere, ma anche frammenti Fab si trovano legati ad alcune HSPs, specialmente a Grp94 (Glucose-regulated Protein94) ed HSP70 (Tramontozzi E, 2008; Tramontozzi E, 2009). L'aspetto peculiare di questi complessi è che, a differenza di quello che avviene normalmente nel complesso antigene-anticorpo, il legame che si forma è irreversibile per cui anche questi CI, come pure quelli non-immuni con legame stabile fra IgG e HSPs, possono rappresentare un rischio immunologico ed essere responsabili dell'aggravamento e diffusione ulteriore della risposta immunitaria già elevata nel diabete di tipo 1 (Tramontozzi E, 2008).

2.2 Interazioni delle Ig con proteine di struttura (recettori)

Le Ig si possono legare a diversi tipi di recettori che sono presenti sia sulle cellule del sistema immunitario che su altri tipi cellulari. In questo caso, la porzione coinvolta nel legame ai recettori è sempre la porzione Fc dell'Ig.

2.2.1 Recettore Fc γ R

Il recettore Fc γ R (*Fragment crystallizable Receptor*) può essere distinto in tre classi: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) e Fc γ RIII (CD16), a loro volta suddivise in isoforme con diversa affinità per le sottoclassi delle IgG e distribuzione tissutale. Il recettore Fc γ RI è espresso sulla superficie di monociti, cellule dendritiche e macrofagi; il recettore Fc γ RII è il recettore più distribuito ed è espresso anche su neutrofili, piastrine, su *natural killer* (NK) *cells* e cellule endoteliali, mentre il terzo tipo di recettore è espresso in modo diverso in base alla sua isoforma: Fc γ RIIIA è espresso su macrofagi, mastociti e cellule NK, mentre Fc γ RIIIB è espresso esclusivamente sui neutrofili (Li X, 2009).

Il recettore Fc γ R è una glicoproteina transmembrana, ed è composta di due (per Fc γ RII e Fc γ RIII) o tre domini extracellulari (per Fc γ RI) (Jovanovic V, 2009). Il legame tra recettore ed IgG avviene tra il primo dominio che fuoriesce dalla membrana e la regione *hinge* delle IgG. La stechiometria di legame tra il recettore e la porzione Fc delle IgG è di 1:1 (Nezlin R, 2004); questo valore stechiometrico è stato ottenuto con metodo di ultracentrifugazione e cromatografia ad esclusione e confermato anche mediante la cristallografia a raggi X (Radaev S, 2001).

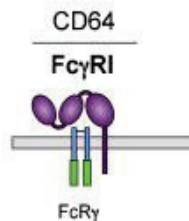


Figura 10. Rappresentazione schematica del recettore Fc γ RI ad alta affinità per le IgG, costituito da tre domini extracellulari, un dominio trans membrana e una corta coda citoplasmatica. (Immagine modificata da Albanesi M, 2012).

La glicosilazione delle IgG gioca un ruolo importante nel legame al recettore Fc γ R, in quanto l'assenza della glicosilazione cambia la struttura del frammento Fc ostacolando in tal modo il legame al recettore Fc γ R. Nell'ambito della famiglia dei recettori Fc γ R si possono distinguere i recettori di attivazione (Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIC and Fc γ RIIIA-B) e d'inibizione (Fc γ RIIB). L'attivazione del recettore può indurre fagocitosi, facilitare la presentazione dell'antigene, indurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno e di citochine e citotossicità cellulare mediata da Ig, eventi questi che sono tutti finalizzati

all'eliminazione dei patogeni. Il segnale di attivazione del recettore $Fc\gamma$ è innescato dall'aggregazione delle molecole di IgG o dal *cross-linking* sui recettori di attivazione. Se le IgG legano in contemporanea un recettore di attivazione e uno di inibizione, il risultato è che il recettore di inibizione prevale e tutti gli eventi seguenti l'attivazione del recettore risultano inibiti.

2.2.2 Recettore FcRn

Il recettore Fc neonatale, o FcRn, è un recettore specifico per le IgG ed è stato definito in questo modo perché identificato per la prima volta a livello del sincizio trofoblastico. In quella circostanza si è appurato che la sua funzione era di trasportare le IgG materne al feto attraverso la placenta fornendo in tal modo l'immunità passiva al feto. Successivamente questo recettore è stato scoperto anche in molti altri tipi cellulari, come, per esempio, nell'endotelio vascolare (Simister NE, 1997), negli epatociti (Tellemann P, 2000), nei macrofagi presenti a livello intestinale, nei *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) e nelle cellule dendritiche (Zhu X, 2001). La presenza dell'FcRn nelle cellule endoteliali adulte è alla base del processo che regola l'omeostasi delle IgG; infatti, il recettore è responsabile del passaggio trans-cellulare (transitosi) delle IgG dal sangue ai tessuti e dai tessuti al sangue, in questo modo ne impedisce la degradazione a livello dei lisosomi (Roopenian DC, 2007).

La cristallizzazione del recettore ha permesso di stabilirne la struttura; si è così visto che è costituito da tre domini extracellulari α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) che compongono la catena pesante di circa 45 kDa, associata in modo non covalente con la $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2m$), del peso circa di 12 kDa (Figura 11). L'associazione tra la catena pesante α e la $\beta 2m$ è critica per il funzionamento del recettore *in vivo* (Zhu X, 2001). Il recettore presenta i domini $\alpha 1$ e $\alpha 2$ accoppiati, mentre il dominio $\alpha 3$ è a contatto con la $\beta 2m$. La co-cristallizzazione della porzione Fc delle IgG con il recettore FcRn ha rivelato che la porzione Fc delle IgG entra in contatto con tutte le subunità del recettore, sia α che $\beta 2m$ (Zhu X, 2002). L'ancoraggio del recettore alla superficie cellulare avviene grazie alla presenza di un dominio trans-membrana e di una corta coda citoplasmatica (Figura 8) (Zhu X, 2002). La catena pesante α presenta un'omologia di sequenza di circa il 25% con il complesso maggiore d'istocompatibilità di tipo I (MHC I) (Baker K, 2009). È interessante notare come alla base di questa omologia di sequenza ci sia la localizzazione del gene per il recettore FcRn (nel cromosoma 19) immediatamente all'esterno della regione che codifica per il complesso MHC I stesso (Baker K, 2009).

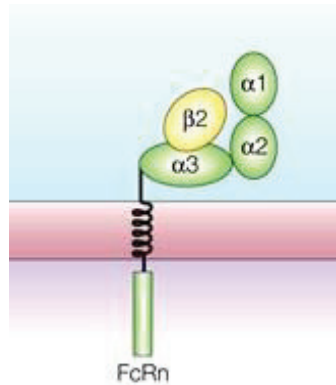


Figura 11. Struttura del recettore FcRn. Si tratta di un eterodimero composto dalla subunità β 2-microglobulina che è associata ad una grande subunità α , consistente di 3 domini extracellulari, inoltre possiede un dominio trans-membrana e una coda citoplasmatica di 50 amminoacidi. (immagine modificata da Rojas R (Rojas R 2002).

Alcune delle funzioni del recettore FcRn, tra cui il trasporto placentare delle IgG e il loro catabolismo, sono state esaminate *in vivo* in topi transgenici deficitari della β 2m. Confrontando i risultati ottenuti nei topi *wild-type* e in quelli transgenici, si è visto che la mancanza della β 2m abolisce il trasporto delle IgG dalla madre al feto, mentre il catabolismo delle IgG aumenta (Israel EJ, 1996; Zhu X, 2002).

Il recettore FcRn oltre alle IgG è anche in grado di legare l'albumina; sulla molecola del recettore sono quindi presenti due siti di interazione per questi ligandi, siti che sono comunque separati. La stechiometria del legame con l'albumina è di 1:1, mentre per il legame con le IgG l'analisi cristallografica ha potuto stabilire la stechiometria di 2:1 (recettore:ligando), per cui due singole molecole di FcRn legano una molecola di IgG in corrispondenza dei domini C_{H2} e C_{H3} della catena pesante (Baker K, 2009). Ulteriori esperimenti hanno evidenziato che la prima molecola di IgG ha un'alta affinità di legame, mentre per la seconda molecola di IgG l'affinità diminuisce (Schuck P, 1999).

La formazione del complesso FcRn-IgG presenta una forte dipendenza dal pH. Il recettore presenta un'affinità di legame per le IgG 100 volte superiore a pH acido (circa 6.0 - 6.5), rispetto al pH neutro (7.0 - 7.4) (Goebel NA, 2008). Questa dipendenza è legata alla titolazione dei ponti salini che si formano tra i residui dell'istidina, presenti nella regione Fc delle IgG, e gli amminoacidi del recettore (specialmente i residui di glutammina e asparagina della catena α 2). A pH 7.0, le istidine che sono coinvolte nel legame sono deprotonate e consentono la dissociazione del ligando dal suo recettore

(Baker K, 2009). Si è visto che la mutazione dei residui di istidina causa l'abolizione, o comunque riduce notevolmente, la capacità di formare il legame con il recettore (Roopenian DC, 2007). Per la formazione del complesso è molto critica anche la presenza di un'isoleucina idrofobica, posizionata in corrispondenza del residuo 253 nella regione Fc dell'IgG che si va a legare al triptofano 133 del FcRn (Roopenian DC, 2007).

3. FARMACOCINETICA DELLE IgG

Il passaggio trans-cellulare delle IgG, sia endogene che esogene avviene mediante un processo di transitosi che, come detto nel paragrafo 2.2.2, è mediato dal recettore FcRn localizzato non solo nell'endotelio vascolare, ma anche nell'epitelio intestinale, nei monociti e nei macrofagi. Il meccanismo generale che regola il passaggio delle IgG prevede che, a seguito del contatto delle IgG con la membrana cellulare, questa subisce un'invaginazione con la formazione di endosomi che internalizzano il fluido contenente le IgG e, grazie all'acidificazione del pH interno, viene facilitato il legame delle IgG al recettore (Figura 12). La vescicola, una volta arrivata al lato opposto della cellula, si fonde con la membrana dove il pH fisiologico, intorno a 7.0, promuove in modo molto rapido la dissociazione delle IgG dal recettore (Roopenian DC, 2007). Il recettore è in grado di effettuare numerosi cicli di transitosi (Cianga P, 2003), ed in questo modo previene la degradazione delle IgG prolungando la loro emivita rispetto a tutte le altre Ig (Kuo TT, 2011). Le IgG che non riescono a legarsi al recettore sono degradate nel lisosoma (Roopenian DC, 2007; Rojas R, 2002). Esperimenti condotti su topi cui era stato eliminato geneticamente il recettore supportano il ruolo chiave del recettore FcRn nel prolungamento dell'emivita delle IgG, in quanto questi topi, rispetto ai topi *wild-type*, mostravano una diminuzione dell'emivita delle IgG (Ghetie V, 1996).

L'emivita delle IgG è in media di 23 giorni, ma le varie sottoclassi presentano delle differenze nel tempo di eliminazione. Per esempio, le IgG3 hanno un'emivita più breve rispetto alle altre sottoclassi, compresa tra i 7 e i 9 giorni. L'uso della marcatura radioattiva ha permesso di stabilire che l'emivita delle IgG è maggiore rispetto a qualsiasi altra proteina del siero. Anche se l'emivita delle IgG è prolungata per la presenza del recettore FcRn, si è visto che l'aumento di concentrazione plasmatica delle IgG porta ad una diminuzione della loro emivita, in quanto il recettore viene saturato e le IgG in eccesso sono degradate (Lobo ED, 2004).

Le IgG sono degradate a livello del fegato, dell'intestino e anche nelle cellule endoteliali. La degradazione è operata da enzimi proteolitici lisosomiali deputati alla degradazione della maggior parte delle proteine seriche, e degli enzimi ubiquitina-dipendenti che degradano le proteine in modo selettivo con consumo di ATP.

La degradazione della molecola di IgG porta alla formazione dei frammenti Fab e Fc che possono essere filtrati dai reni ed escreti, ma possono essere anche riassorbiti e/o degradati dalle cellule dei tubuli prossimali del nefrone (Lobo ED, 2004). Le IgG intatte, invece, non possono essere filtrate dai reni ed eliminate attraverso le urine a causa delle loro grandi dimensioni.

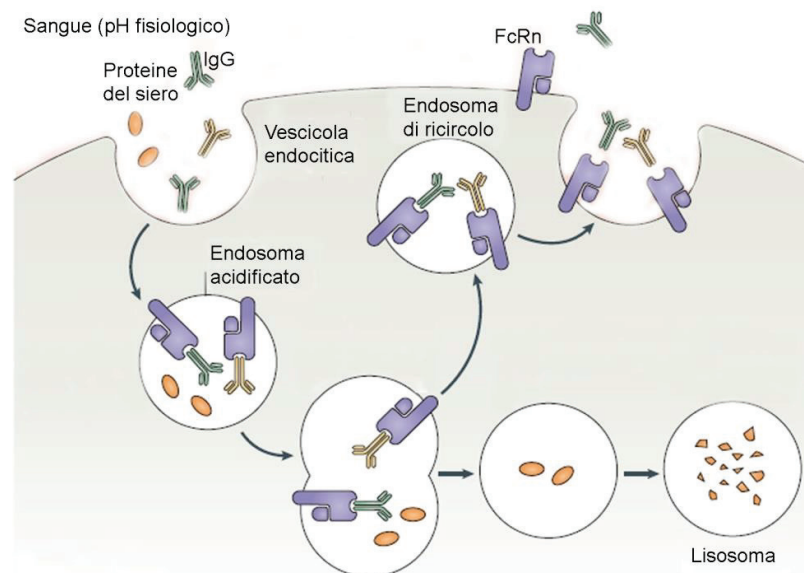


Figura 12. Meccanismo proposto di transitosi delle IgG. Le IgG prendono contatto con il loro recettore a livello di membrana che, a seguito del legame, subisce delle modificazioni (invaginazione) per cui attorno alle IgG internalizzate e legate al recettore FcRn si forma una vescicola endocitica a pH acido che viene rilasciata all'interno della cellula. La vescicola endocitica attraversa la cellula e rilascia le IgG sul versante opposto nella circolazione sanguigna (o anche nel versante extra-cellulare, grazie alla bi-direzionalità del processo). Il processo prevede che la membrana della vescicola si fonda con la membrana cellulare e grazie al pH fisiologico dell'ambiente esterno (sangue e/o spazio extra-cellulare) le IgG si staccano dal recettore e vengano rilasciate. (Immagine modificata da Roopenian DC, 2007).

4. SITUAZIONI PATOLOGICHE CHE SI ASSOCIANO AD ALTERAZIONI DELLE Ig

Alcune patologie si possono accompagnare ad alterazioni delle Ig, sia quantitative che qualitative.

4.1 Alterazioni quantitative

Si è sempre creduto che l'unica fonte per la produzione delle Ig fossero i linfociti B maturi ma, in quest'ultimo decennio a seguito di esperimenti specifici, si è scoperto che le Ig possono essere espresse anche da tipi cellulari diversi, come per esempio cellule di carcinoma epiteliale, cellule del cancro del colon, cellule del carcinoma dell'esofago, cellule di carcinoma della mammella, come le linee cellulari MCF-7 e MDA-MB-231 (Kimoto Y, 1998). In seguito sono state scoperte anche altre linee cellulari tumorali umane che possono secernere Ig, come le linee di cellule tumorali di polmone, fegato e colon che non presentano una specificità ben definita (Qiu X, 2003) e possono esprimere l'mRNA delle catene pesanti della regione variabile delle IgG (Babbage G, 2006). Chen e Gu (Chen Z, 2007) hanno esaminato in dettaglio due aspetti del processo di formazione delle IgG in cellule diverse dai linfociti B: uno riguarda l'espressione di RAG 1 e 2 (*recombination activating gene*) e l'altro l'espressione delle IgG nel citoplasma. Le proteine RAG sono presenti unicamente nei linfociti B immaturi, l'unico sito in cui avviene la ricombinazione delle Ig, e sono responsabili della formazione del tetramero che inizia il processo di riarrangiamento VDJ, in quanto riescono a legare e tagliare il doppio filamento del DNA in specifici siti di ricombinazione. Le proteine RAG 1 e 2 sono state trovate in tutte le linee cellulari che esprimono le IgG (Chen Z, 2007). Le cellule tumorali, però, non producono solo IgG, ma anche IgM, seppur in concentrazione molto inferiore alle IgG (Qui X, 2003). Babbage (Babbage G, 2006) ha trovato che le linee cellulari di cancro alla mammella possono esprimere la catena pesante sia di IgM sia di IgA. Questi studi hanno dimostrato che anche le linee cellulari tumorali sono in grado di secernere Ig, e questa loro capacità può portare ad alterazioni nella concentrazione plasmatica delle stesse (Chen Z, 2007).

Anche nei pazienti diabetici si sono riscontrate alterazioni quantitative delle Ig; alla fine degli anni '90 è stato dimostrato che pazienti adulti cui era stato diagnosticato il diabete di tipo 1 (insulino-dipendente), presentavano nel plasma alti livelli di IgM e IgA e bassi livelli di IgG, rispetto ai soggetti sani (Gorus FK, 1998). Nel 2011 Svensson e colleghi

(Svensson J, 2012) hanno esaminato nei pazienti diabetici la correlazione esistente fra la produzione delle Ig e l'età e dimostrato che i pazienti diabetici presentavano una maturazione più lenta delle IgG e delle IgA e più veloce per le IgE, risultati questi che indicavano una maturazione più lenta del sistema immunitario dei soggetti diabetici rispetto a quello dei soggetti sani (Svensson J, 2012).

4.2 Alterazioni qualitative

Le alterazioni della glicosilazione delle Ig sono state individuate per la prima volta nel secolo scorso, attorno agli anni '80. È stato visto che situazioni patologiche come il cancro potevano provocare dei cambiamenti nella glicosilazione delle Ig, sia nel senso di indurre una sovra-espressione come pure una sotto-espressione o neo-espressione dei carboidrati normalmente presenti. Queste modificazioni sono state attribuite all'alterata espressione degli enzimi glicosiltransferasi presenti nel Golgi, indotti dal tumore. Una delle più comuni alterazioni che si riscontrano riguarda l'aumento nelle ramificazioni dei raggruppamenti glucidici e quindi l'incremento delle dimensioni del glicano legato al gruppo amminico. La maggior ramificazione del carboidrato crea maggiori siti cui si possono legare gli acidi sialici, e questo è stato correlato ad una maggiore velocità di crescita del tumore e di sviluppo metastatico (Saldova R, 2008).

5. APPLICAZIONI TERAPEUTICHE DELLE Ig

5.1 Cenni storici

L'uso delle Ig in terapia iniziò attorno agli anni '80, quando il premio Nobel Emil von Behring e il suo collega Shibasaburo Kitasato scoprirono che gli anticorpi sono una importante componente del sistema immunitario (Hartung HP, 2008). Nel 1981 Imbach utilizzò per primo le Ig per via endovenosa (IVIG, *Intravenous immunoglobulin*) contro le infiammazioni, sia a scopo profilattico che terapeutico, e più tardi le usò nella terapia di patologie di immunodeficienza. Molti dei pazienti cui Imbach somministrò le IVIG presentavano anche la Porpora Trombocitopenica Idiopatica (PTI), malattia autoimmune caratterizzata da piastrinopenia. Si vide che dopo il trattamento con le IVIG la conta piastrinica dei pazienti era molto aumentata, riscontro questo che determinò l'utilizzo delle IVIG nella terapia di PTI anche in pazienti pediatriche, con

miglioramento del decorso della malattia (Imbach P, 1981; Ballow M, 2011). A seguito di questi studi vi fu un'esplosione dell'uso delle IVIG sia nelle terapie autoimmunitarie che nei disordini infiammatori.

5.2 Indicazioni cliniche per la terapia con IgG

Le principali indicazioni terapeutiche delle IgG includono le immunodeficienze primarie o secondarie, caratterizzate da assenza o deficitaria produzione anticorpale, e le malattie autoimmunitarie acute o croniche (Tabella 2) che interessano una vasta gamma di tessuti e organi, come la pelle, le articolazioni, il sistema nervoso centrale e quello ematopoietico (Nimmerjahn F, 2008). Nel primo caso, la somministrazione delle IgG si configura come terapia sostitutiva, mentre nel secondo caso le IgG dovrebbero svolgere un'azione anti-infiammatoria.

Tra le immunodeficienze, l'indicazione più chiara per l'uso delle IVIG è l'agammaglobulinemia, una malattia rara che colpisce un maschio ogni 100000 nati entro i primi 5 mesi di vita e che è caratterizzata dalla mancanza di Ig. In questo caso la somministrazione di IgG ha dimostrato un chiaro beneficio in termini di riduzione delle infiammazioni sia acute che croniche (Orange JS, 2006). Le IVIG sono inoltre utilizzate nei pazienti con leucemia linfocitica cronica, in cui riducono in modo significativo il numero di infezioni (Weeks JC, 1991).

TERAPIA SOSTITUTIVA (BASSE DOSI TERAPEUTICHE)	AZIONE ANTI-Infiammatoria (ALTE DOSI TERAPEUTICHE)	
	APPROVATE	OFF-LABEL
CVID Infezione da HIV Trapianto del midollo osseo Leucemia dei linfociti B Mieloma multiplo	Trombocitopenia purpurea idiopatica Sindrome di Guillain-Barrè Malattia di Kawasaki CIDP	Neuropatia autoimmune Anemia emolitica autoimmune Sclerosi multipla Miastenia grave Vasculite sistemica Dermatomiosite Polimiosite Lupus sistemico eritematoso Sindrome antifosfolipidica

Tabella 2: Patologie in cui è previsto l'impiego clinico delle IVIG. (CVID: immunodeficienza comune variabile; CIDP: polineuropatia cronica demielinizzante idiopatica) (Immagine modificata da Nimmerjahn F, 2008).

Quando la produzione di IgG è deficitaria ma non completamente assente, l'uso delle IVIG è molto più complesso. In questi casi i livelli minimi di IgG possono essere inaffidabili e non dovrebbero essere presi in considerazione come parametri di riferimento per guidare la terapia. Un esempio è l'immunodeficienza comune variabile (CVID), una malattia presente in soggetti adulti che manifestano un difetto nella produzione delle classi più importanti delle Ig (Orange JS, 2006).

Normalmente la dose di IVIG che si usa nella terapia sostitutiva è diversa rispetto a quella impiegata nel trattamento di condizioni infiammatorie. Nella terapia sostitutiva si raccomanda una dose terapeutica relativamente bassa e con un trattamento ripetuto ogni 3-4 settimane, tempo di emivita delle IgG. Invece, per la terapia anti-infiammatoria le dosi da somministrare sono più elevate, comprese nell'intervallo di 1-3 g/Kg di peso corporeo (Gelfand EW, 2006).

Normalmente le IgG sono somministrate per via endovenosa o intramuscolare. Come alternativa a queste due principali vie parenterali è stata utilizzata anche la via sottocutanea, che secondo alcuni studi, sembra essere equivalente da un punto di vista terapeutico.

6. MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DEGLI EFFETTI TERAPEUTICI DELLE IgG

In questi ultimi anni sono state proposte numerose ipotesi sul possibile meccanismo d'azione con cui le IgG esplicano la loro azione terapeutica in così diverse patologie. Nessuna di esse comunque riesce da sola a spiegare tutte le molteplici azioni delle IgG, ma ognuna non escludendo le altre può contribuire in parte alla comprensione del complesso insieme di effetti prodotti dalle IgG. Verranno presi in considerazione qui di seguito alcuni meccanismi molecolari che hanno trovato più largo consenso fra i ricercatori.

Gli studi condotti sui modelli *in vivo*, assieme ai dati raccolti sui pazienti cui sono state somministrate le IgG indicano che l'effetto terapeutico delle IgG è mediato sia dal frammento F(ab)₂ come pure dal frammento Fc.

I principali meccanismi che sono stati individuati riguardano: 1) la saturazione del recettore FcRn, 2) il blocco del recettore FcγR e 3) la sovra-stimolazione (*up-regulation*) del recettore inibitorio FcγRIIB.

Introduzione

La prima teoria prevede che le IgG somministrate in alte dosi competano con gli anticorpi patologici (auto-anticorpi) presenti in circolo per il legame al recettore FcRn che verrebbe così saturato (Figura 14, modello 1). Questo porterebbe ad un aumento del catabolismo degli auto-anticorpi (Tha-In T, 2008). Questa ipotesi, molto difficile da valutare *in vitro*, è stata testata nei topi in cui era stato rimosso o bloccato il recettore FcRn; si era così potuto osservare che la soppressione del recettore causava una rapida *clearance* degli anticorpi con una drastica riduzione del livello serico di IgG (Nimmerjahn F, 2007).

Il secondo meccanismo prende in considerazione il ruolo dei recettori FcγRs. In generale questi recettori sono presenti in una grande varietà di cellule immuni e riconoscono la porzione Fc delle IgG (paragrafo 2.2.1). La somministrazione di alte dosi di IgG fa sì che queste IgG competano con i complessi immuni per il legame al recettore, in questo modo riescono a bloccare il recettore FcγRs attivatorio, con conseguente soppressione dell'attività pro-infiammatoria (Lux A, 2010; Tha-In, T 2008) (Figura 14, modello 2). Quando il recettore viene bloccato dalle IgG, le funzioni effettrici, come la fagocitosi e la secrezione di citochine pro-infiammatorie vengono inibite (Boruchov AM 2005, Tha-In T 2008).

Il terzo meccanismo accreditato coinvolge il recettore inibitorio FcγRIIB, un recettore a bassa affinità per le IgG. L'attività anti-infiammatoria indotta dalle IgG sembra dipendere in questo caso dall'aumentata espressione del recettore FcγRIIB a livello dei macrofagi effettori (Figura 14, modello 3). Da solo, comunque, questo meccanismo non può spiegare l'attività anti-infiammatoria dato che il trattamento con IgG sembra indurre anche una diminuzione dell'espressione dei recettori attivatori FcγRs (Baerenwaldt A 2008).

Un altro meccanismo con cui le IVIG possono esplicare attività anti-infiammatoria prende in considerazione il ruolo di alcuni anticorpi, presenti nella preparazione da somministrare, che sono diretti contro gli auto-anticorpi sviluppati nella patologia autoimmune e quindi verrebbero inibiti nella loro azione infiammatoria. (Durandy A, 2009).

Sono stati anche descritti altri effetti che IgG possono provocare sulle cellule dell'immunità sia innata che adattativa. Per esempio, si è visto che la somministrazione di alte dosi di IVIG inibisce sia la proliferazione che la maturazione delle cellule dendritiche, oltre ad inibire la secrezione di citochine pro-infiammatorie ed aumentare la produzione di citochine anti-infiammatorie (Tha-In T 2008). Inoltre il trattamento con le

IVIG sopprime l'attivazione di monociti e di macrofagi e ne abbassa i livelli in circolazione (Tha-In T 2008). L'azione delle IVIG si manifesta anche sulle cellule dell'immunità adattativa mediante l'inibizione della proliferazione dei linfociti T (Tha-In T 2008).

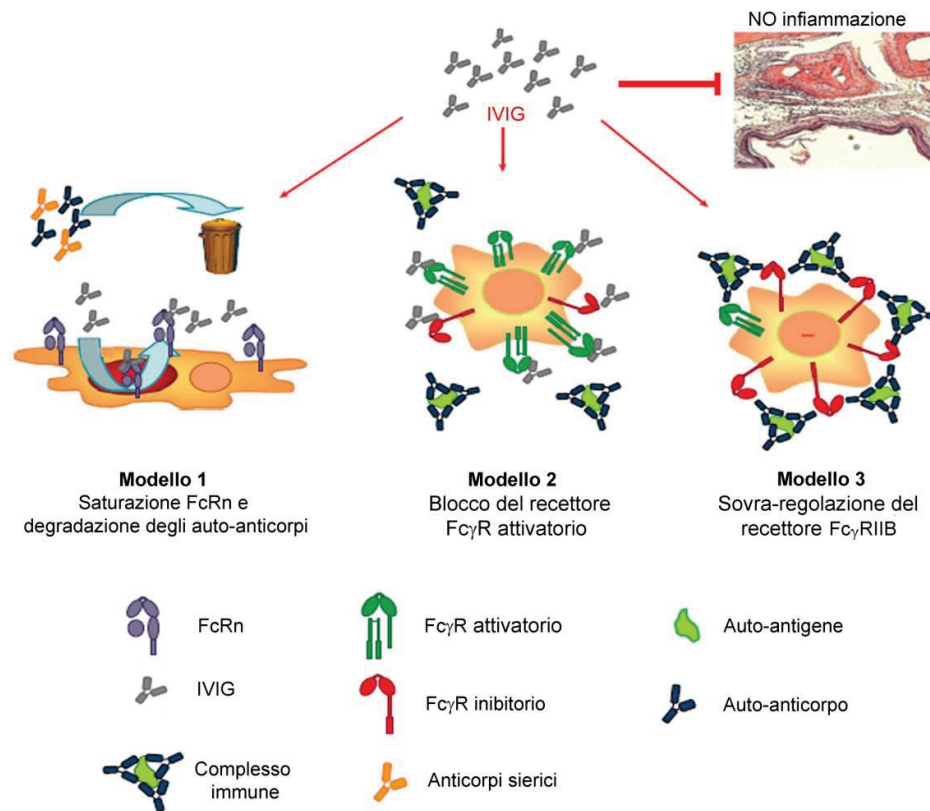


Figura 14. Modelli proposti per spiegare l'attività anti-infiammatoria delle IgG. Nel modello 1, alte dosi di IgG nelle preparazioni di IVIG possono competere con gli auto-anticorpi per il legame al FcRn e questo porta ad una aumentata *clearance* degli auto-anticorpi. Nel modello 2, le IgG presenti nel preparato di IVIG possono legare il recettore attivatorio Fc γ R ed evitare il legame con i complessi immuni. Nel modello 3, l'attività delle IVIG è dipendente dalla presenza del recettore inibitorio Fc γ RIIB. Immagine modificata da Nimmerjahn F, 2008).

OBIETTIVI DELLA TESI

Le IgG, vengono sempre più frequentemente utilizzate nella terapia di numerose malattie di natura autoimmune e nelle forme gravi di allergia. Nonostante il largo impiego terapeutico, non si conoscono con precisione i meccanismi molecolari con cui le IgG riescono ad esplicare effetti benefici in un'ampia varietà di condizioni patologiche di natura immunitaria/infiammatoria. Sono stati chiamati in causa, fra gli altri, possibili effetti sull'espressione e funzione dei recettori per la porzione Fc delle IgG, l'azione di differenziazione dei linfociti T e B, la modulazione delle cellule responsabili della presentazione dell'antigene. Le ipotesi sul meccanismo d'azione avanzate finora sono molteplici e riguardano quasi esclusivamente gli effetti sulle cellule dell'immunità e/o su recettori specifici presenti sulle cellule dell'immunità. Fare luce sul meccanismo d'azione è comunque un obiettivo di primaria importanza per poter stabilire il corretto dosaggio di IgG da somministrare nelle diverse patologie senza incorrere in effetti indesiderati. Un possibile bersaglio molecolare delle IgG, che non è stato finora oggetto di studio, è l'endotelio vasale col quale le IgG sono costantemente a contatto dopo la loro somministrazione per via endovenosa.

Lo scopo del nostro studio è stato appunto quello di verificare se le IgG avessero degli effetti sulle cellule endoteliali e per questo sono state prese in considerazione le HUVECs, che rappresentano un modello di cellula endoteliale particolare con caratteristiche delle cellule dell'immunità nativa. Su questo modello cellulare si sono voluti studiare in modo approfondito gli effetti delle IgG, sulla morfologia cellulare e sull'espressione di un *pattern* di proteine cellulari indice dell'attivazione di specifiche vie metaboliche. In particolare, era importante verificare se le IgG potevano indurre la loro stessa espressione e secrezione non solo nelle HUVECs ma anche in cellule fisiologicamente deputate alla produzione e secrezione di anticorpi come i linfociti B presenti nella popolazione di cellule mononucleate purificate dal sangue periferico umano. Questo approccio sperimentale poteva dare una risposta al quesito se le cellule endoteliali vascolari contribuivano attivamente, assieme alle cellule circolanti dell'immunità, a determinare e sostenere gli effetti terapeutici benefici delle IgG.

MATERIALI

I materiali utilizzati per elettroforesi e *Western blotting* sono: saccarosio, Triton X100, Trizma-base (TRIS), Glicina, Tween-20, EDTA, persolfato d'ammonio (PSA), Orange G, Glicerolo, Acrilamide/bis-acrilamide, Coomassie brilliant blue G-250. Negli esperimenti di *Western blotting* stati usati i seguenti anticorpi primari: policlonali da capra anti-HSP40, policlonali da coniglio anti-HSP90 α/β umana, monoclonali da topo anti-Akt, policlonali da coniglio anti-Akt fosforilata e policlonali da coniglio anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA); monoclonali da topo anti-HSP70 umana, monoclonali da topo anti-MMP9 (StressGen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada); policlonali da pecora anti-IgG (H&L) umane (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA); policlonali da capra anti-Fab, monoclonali da topo anti-Fc e monoclonali da topo anti-FcRn (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA); policlonali da coniglio anti-ERK1/2 fosforilata e anti ERK totale (Cell Signaling & Neuroscience, St. Luis, MI, USA). Sono stati usati anticorpi secondari coniugati direttamente alla fosfatasi alcalina (AP) (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) o alla perossidasi del rafano (HRP) (KPL, Gaithersburg, MD, USA) diretti contro gli anticorpi primari da capra, pecora, topo e coniglio. Inoltre sono stati utilizzati anticorpi secondari biotinilati diretti contro gli anticorpi primari da coniglio e topo (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) e streptavidina coniugata con AP (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) o con HRP (KPL, Gaithersburg, MD, USA).

Per le colture cellulari sono stati usati i seguenti materiali: collagenasi di tipo 2 (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ), dimetil-solfossido (DMSO), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), *Ficoll-Paque Plus* (Amersham Bioscience, Uppsala, Svezia); IgG purificate da plasma umano, non immuni, L-glutamina, *Pokeweed Mitogen* (PWM), puromicina, terreno RPMI 1640 da Euroclone (Euroclone Life Sciences Division, Milano, Italia); siero fetale bovino (FBS a basso contenuto di IgG, <100 $\mu\text{g/ml}$), terreno EBM, penicillina, streptomina, fattore di crescita epidermico umano ricombinante (rHEGF), estratto di cervello bovino (BBE), idrocortisone, tripsina bovina (Lonza Waskerville, Inc. Waskerville, MD), inibitori di proteasi (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

Per la Real-Time PCR sono stati usati: RNeasy Mini Kit (Qiagen, Manchester Limited, Manchester M15 6SH, U. K.); iScript cDNA Synthesis kit, SsoFast Eva Green

Materiali

Supermix (Bio Rad, Hercules, CA, USA), HP PCR Product Purification kit (Roche, Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland).

Tutti gli altri reagenti di uso comune sono al più alto grado di purezza (Sigma Chemicals, St. Luis, MO, USA) e Fluka (Fluka Chemie, GmbH, Buchs, Swisse).

Per l'immunofluorescenza sono stati usati: saponina, RNasi, ioduro di propidio e Mowiol (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA), Ac primari anti-IgG umane da capra Dylight 488 (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) e anti-actina da topo (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA), Ac secondario diretto contro Ac primario da topo Cy3-coniugato.

METODI

1. ESPERIMENTI DI PURIFICAZIONE DELLE IgG DA PLASMA UMANO

1.1 Cromatografia per affinità

Esistono diverse tecniche cromatografiche che possono essere utilizzate per la purificazione delle proteine. La scelta di una tecnica cromatografica rispetto a un'altra dipende dal tipo di proteine e dalle loro proprietà chimiche e/o biologiche. Il principio della separazione cromatografica consiste nell'uso di una fase stazionaria (matrice, impaccata nella colonna) e di una fase mobile (eluente) che passa attraverso la fase stazionaria. La soluzione proteica passa attraverso la fase stazionaria della colonna e le molecole con differenti specificità e/o affinità alla matrice si distribuiscono in modo differente nelle due fasi: quelle con alta affinità per la fase stazionaria sono trattenute al suo interno e quindi ritardate nell'eluizione, mentre molecole non affini o molto poco affini non si legano alla fase stazionaria ed eluiscono per prime. La scelta della matrice corretta rappresenta lo *step* più importante in ogni processo cromatografico, in quanto le matrici devono essere chimicamente stabili (anche in condizioni estreme) ed inerti (per evitare legami non specifici delle proteine d'interesse).

La cromatografia di affinità è una delle procedure più potenti che possono essere applicate per la purificazione di una proteina. Il metodo è utile per assorbire selettivamente le proteine ad una fase solida, progettata specificamente per avere legami di tipo reversibile con la proteina. In questo modo si ottiene un'elevata concentrazione della proteina desiderata e un alto recupero dell'attività biologica per le condizioni fisiologiche del procedimento. La scelta della matrice è particolarmente importante in cromatografia di affinità, in quanto la matrice deve avere caratteristiche specifiche: 1) essere idrofila, per ridurre le interazioni non specifiche; 2) avere pori grandi, che permettono a tutte le aree della matrice di essere disponibili per la maggior parte delle molecole nella miscela (utile, in particolare, per la separazione di molecole molto grandi o virus); 3) essere rigida, per resistere alla pressione del flusso d'impaccamento e del solvente durante l'eluizione o il lavaggio; 4) essere inerte, per evitare di interferire nella fase di separazione; 5) essere chimicamente stabile, per garantire stabilità a tutti i tipi di solventi utilizzati nel processo di separazione. La maggior parte delle matrici per la

Metodi

cromatografia di affinità sono costituite da ligandi con gruppi specifici pronti per l'uso e sono utili per isolare intere famiglie di biomolecole che condividono proprietà comuni, compresi enzimi, polisaccaridi, anticorpi, endotossine, chinasi, lipoproteine, DNA e tRNA. Il legame delle proteine ad un ligando avviene attraverso il carbossile o attraverso il gruppo amminico ed è basato sulla specifica affinità per quel particolare ligando. Il legame è generalmente non covalente in natura e, anche se specifico, le interazioni comportano la formazione di legami idrogeno. Il metodo migliore da utilizzare in cromatografia di affinità è l'eluizione specifica basata sull'azione competitiva del tampone di eluizione per il ligando. La scelta di un eluente con affinità per il ligando maggiore di quella della proteina sposta la proteina dal ligando. Se non c'è un eluente specifico per la proteina d'interesse si può utilizzare un eluente non specifico (ad esempio una soluzione salina) oppure si può cambiare il pH o la temperatura della soluzione) (Wilson K, 1995; Ostrove S, 1990).

La tecnica convenzionale per la purificazione delle Immunoglobuline (Ig) G è la cromatografia di affinità su colonna di Proteina A o Proteina G, proteine isolate dalla parete cellulare batterica, la prima dallo *Staphylococcus aureus* e la seconda dallo *Streptococcus* di gruppo G. Proteina A e G hanno siti di legame specifici per talune classi di Ig e il legame avviene con la porzione Fc della molecola di Ig. In particolare, la Proteina A lega le IgG (e la maggior parte delle sue sottoclassi), IgM, IgA e IgD, mentre la Proteina G lega esclusivamente le IgG e quasi tutte le sue sottoclassi, ma non lega le altre classi di Ig. La Proteina G ha un'affinità maggiore della proteina A per le IgG umane e la forma ricombinante della Proteina G ha anche il vantaggio di non legare l'albumina, poiché ha subito una modificazione strutturale atta ad eliminare il sito di legame per l'albumina presente invece nella forma della proteina intatta.

Nei nostri esperimenti di purificazione delle IgG da plasma umano abbiamo usato una colonna di Proteina G (di volume di 1 ml) legata ad una resina di agarosio (*Sepharose™ High Performance, Hi-Trap™ Protein G HP*, Amersham Biosciences) applicata ad un apparecchio FPLC (Pharmacia LKB) con detector UV. La Proteina G nella colonna *Hi-Trap* è una proteina ricombinante espressa in *E. coli* con modificazione genica della regione di legame per l'albumina che permette di avere un'elevata selettività di legame per le IgG.

Nei nostri esperimenti, abbiamo raccolto il sangue di quattro volontari sani che è stato centrifugato (3000 rpm per 10 minuti in una centrifuga refrigerata) per ottenere il plasma su cui è stata determinata la concentrazione proteica (utilizzando il metodo

spettrofotometrico, misurando l'assorbanza a 280 nm). Dopo aver preparato la colonna con lavaggi ripetuti (5 ml ciascuno) di eluente A (tampone fosfato 20 mM, pH 7.0), di eluente B (tampone glicina 0.1 M, pH 2.5) e ancora di eluente A, sono stati caricati in colonna 90 mg di proteine solubilizzate in 1.5 ml di eluente A fatte poi eluire con 5 ml di eluente A ad un flusso di 0.5 ml/min. L'eluente A facilita il legame delle IgG alla Proteina G favorendo in tal modo l'eluizione delle molecole a essa non affini (eluizione nel *void volume*). L'aggiunta dell'eluente B causa invece il distacco delle IgG dalla matrice. Le IgG eluite dalla colonna sono state raccolte in frazioni e l'eluizione è stata seguita monitorando l'assorbanza delle proteine a 280 nm. Appena eluite, le frazioni sono state raccolte in tubi contenenti tampone Tris-HCl (1 M, pH 9.0, di volume variabile da 60 µl a 200 µl a seconda del volume del materiale eluito), necessario per ristabilire le condizioni di neutralità alterate dall'eluente B.

1.2 Dialisi

La dialisi è la tecnica più utilizzata per la rimozione di soluti o per cambi di tampone. Questa metodica si basa sulla capacità di una membrana semipermeabile di permettere la diffusione di molecole di dimensioni diverse. In base al taglio molecolare della membrana (*Molecular Weight Cut-Off*, MWCO) le molecole con peso molecolare (PM) maggiore del *cut-off* della membrana sono normalmente trattenute, mentre quelle con PM minore diffondono attraverso i pori (Pohl T 1990). Il processo è guidato dal gradiente di concentrazione dei soluti ai due lati della membrana e la velocità di trasferimento del soluto diminuisce fino al raggiungimento dell'equilibrio osmotico. Il cambio del liquido di dialisi accelera il processo di eliminazione dei soluti.

Nei nostri esperimenti, la dialisi delle frazioni di IgG eluite da colonna di Proteina G è stata effettuata mediante l'utilizzo di tubi di dialisi con MWCO di 3500 (Spectra-Por, A.H. Thomas, Philadelphia, Pa, USA) ed è stata condotta a +4 °C per 20 ore, contro un volume di acqua milli-Q 500 volte maggiore di quello del campione.

1.3 Determinazione della concentrazione proteica

In molti casi le soluzioni proteiche ottenute per purificazione di fluidi biologici contengono più di una specie di proteine, e, nella maggior parte dei casi, le proteine coniugate con zuccheri (glicoproteine) o lipidi (lipoproteine).

Metodi

È difficile che un singolo metodo possa dare una soddisfacente determinazione della concentrazione proteica soprattutto quando più di una specie proteica è presente nella soluzione. La scelta appropriata del metodo dipende da diversi criteri: la concentrazione della proteina, la specificità del test, la presenza di sostanze che possono interferire con il dosaggio, la facilità di esecuzione del test e la sua affidabilità (Ninfa AJ, 2000). La gamma di sensibilità di ciascun saggio dipende in modo cruciale dal tipo di proteina da misurare e dal volume del campione.

1.3.1 Metodo spettrofotometrico di assorbimento UV

Il metodo spettrofotometrico rappresenta una misura quantitativa delle proteine che si basa sulle proprietà di riflessione o trasmissione della proteina in funzione della lunghezza d'onda. Le proteine assorbono la luce nella regione dell'UV con due massimi d'assorbimento alle λ di 280 nm e 200 nm. L'assorbimento a 280 nm è legato alla presenza di aminoacidi contenenti anelli aromatici, soprattutto Triptofano, Tirosina, Istidina e Fenilalanina. Sebbene vi sia un elevato grado di variabilità nell'assorbanza a 280 nm da proteina a proteina, questa lunghezza d'onda è ritenuta conveniente per la misura della concentrazione proteica in quanto un minor numero di sostanze chimiche (compresi molti tamponi) assorbe a 280 nm rispetto a lunghezze d'onda più brevi. Il legame peptidico assorbe alle lunghezze d'onda minori di 210 nm, mentre le glicoproteine possono dare un contributo di assorbimento alla λ di 260 nm (Stoscheck CM, 1990; Wilson K, 1995).

I vantaggi del metodo spettrofotometrico sono molteplici: 1) può essere effettuato direttamente sul campione, senza l'aggiunta di reagenti; 2) può essere eseguito rapidamente poiché non ha necessità di incubazione del campione; 3) il rapporto tra la concentrazione di proteina e l'assorbanza è lineare; 4) il campione può essere recuperato al termine della misurazione.

Il metodo dell'assorbimento UV a 280 nm può essere utilizzato quando la concentrazione proteica in una miscela proteica è uguale a o maggiore di 1 mg/ml. In questo caso la concentrazione proteica può essere stimata misurando la sola assorbanza a 280 nm

$$\text{Concentrazione proteica (mg/ml)} = \text{Abs}_{280 \text{ nm}}$$

Per stimare la concentrazione proteica quando la soluzione proteica contiene acidi nucleici (che assorbono a 280 nm) o glicoproteine la formula da applicare è

$$\text{Concentrazione proteica (mg/ml)} = 1.55 \times \text{Abs}_{280 \text{ nm}} - 0.76 \times \text{Abs}_{260 \text{ nm}}$$

Per la quantificazione della concentrazione proteica nelle frazioni di IgG abbiamo utilizzato il metodo di assorbimento all'UV a 280 nm; le misure sono state effettuate con uno spettrofotometro Beckman Coulter DU800 (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA), utilizzando una cella di quarzo con cammino ottico di 1 cm.

1.4 Liofilizzazione

Quando le soluzioni proteiche erano poco concentrate, si è proceduto alla liofilizzazione del campione. La liofilizzazione è una forma d'essiccamento sotto vuoto, condotta su un materiale congelato: a pressioni molto basse il solvente sublima, passando dallo stato solido a quello di gas. Con la liofilizzazione si ottiene un preparato a basso contenuto d'umidità e facilmente solubile. Abbiamo utilizzato questa tecnica per ottenere una soluzione proteica concentrata a partire da un volume di 2 ml.

2 ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA

2.1 Elettroforesi

L'elettroforesi è un processo per cui particelle cariche migrano in un mezzo sotto l'influenza di un campo elettrico. Molte molecole d'interesse biologico sono presenti in soluzione come specie elettricamente cariche. La mobilità della specie carica dipende essenzialmente da tre fattori: la carica della molecola, la differenza di potenziale del campo elettrico e la forza frizionale del mezzo di supporto (gel) che contrasta il movimento. Quando si applica una differenza di potenziale, molecole con carica elettrica totale diversa si separano in base alla loro mobilità elettroforetica. Anche molecole con carica elettrica uguale, ma con dimensioni molecolari differenti, si separano per effetto di forze frizionali differenti. Tra i due elettrodi, gli ioni di una soluzione tampone permettono la conduzione della corrente. In base alla legge di Ohm è possibile favorire la separazione elettroforetica aumentando il voltaggio applicato. Contemporaneamente all'aumento dell'intensità di corrente, vi è però un aumento di potenza dissipata sotto forma di calore. Ciò determina un aumento della velocità di diffusione dei campioni, che porta alla formazione di bande poco definite, alla comparsa di correnti convettive che determinano il mescolamento dei campioni separati, alla denaturazione di campioni poco stabili ad alte temperature, ad una diminuzione di

Metodi

viscosità del mezzo e quindi ad una diminuzione della resistenza. Per evitare ciò si utilizzano alimentatori che forniscono una corrente costante e dei sistemi di raffreddamento atti a dissipare il calore prodotto (Wilson K 1995).

Il mezzo di supporto consente la separazione dei campioni mediante un “effetto setaccio” che fraziona le molecole in base al rapporto carica/massa. Infatti, il mezzo di supporto è costituito da una sostanza reticolata che diminuisce la mobilità delle molecole di dimensioni maggiori per un aumento delle forze d’attrito. Il mezzo di supporto di elezione per l’elettroforesi delle proteine è l’acrilamide polimerizzata, che si presenta sotto forma di gel e la cui porosità può essere controllata variando la percentuale di acrilamide e/o il numero di legami crociati (Ninfa AJ, 2000).

2.2 SDS-PAGE

L’elettroforesi su gel di poliacrilamide con sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE) è un metodo eccellente per l’identificazione delle proteine e per definire l’omogeneità delle frazioni purificate. Permette, inoltre, la determinazione del peso molecolare delle proteine presenti in una miscela, stabilita in base al confronto con il peso molecolare di standard proteici (Garfin DE, 1990). Nell’SDS-PAGE il sodio dodecilsolfato (SDS), $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_2\text{OSO-Na}^+$ rende uniformi le caratteristiche idrodinamiche e di carica delle proteine in modo che la separazione su gel si basi solo sulla grandezza e forma delle macromolecole. Come detergente anionico l’SDS si lega infatti alle catene funzionali in un rapporto di circa 1.4 mg SDS/mg proteine, conferendo al complesso una omogenea carica negativa. Le interazioni con l’SDS denaturano le proteine distruggendone tutti i legami non covalenti. Il trattamento aggiuntivo dei campioni con agenti riducenti, quali β -mercaptoetanololo o ditiotreitolo (DTT), che scindono i legami disolfuro, e/o con la bollitura, permette un’ulteriore denaturazione delle proteine. La corsa elettroforetica va dal catodo (posto in alto nell’apparecchio) verso l’anodo (in basso) e la migrazione dei complessi risulta inversamente proporzionale al logaritmo del loro peso molecolare. In particolare, le molecole a peso molecolare minore migrano più velocemente nella matrice, mentre quelle a peso molecolare maggiore sono trattenute nella loro corsa elettroforetica. Il peso molecolare può essere perciò calcolato sulla base della mobilità elettroforetica.

Nei nostri esperimenti sono stati utilizzati due tipologie di gel, i gel preformati in gradiente di poliacrilamide dal 4% al 20% (Novex 4-20% Tris-Glycine Gel, Life

Technologies, Carlsbad, CA, USA) e i gel di poliacrilamide al 10% preparati al momento dell'uso in tampone Tris-HCl (0.375 M, pH 8.8) facendo co-polimerizzare l'acrilamide con l'N,N'-metilenbisacrilamide (in rapporto con l'acrilamide di 37.5:1), monomero 47i funzionale in grado di formare legami crociati in presenza di un catalizzatore, il persolfato d'ammonio (PSA, al 10%) e di un iniziatore, la N,N,N',N'-tetrametilendiammina (TEMED). Il TEMED catalizza la trasformazione dello ione persolfato nel suo corrispondente radicale libero che, a sua volta, catalizza la polimerizzazione dell'acrilamide (Wilson K, 1995; Garfin DE, 1990). Le dimensioni dei pori e il grado di reticolazione del gel sono determinati dalle percentuali reciproche dei due monomeri di acrilamide. Per i nostri esperimenti, la scelta di acrilamide al 10% era funzionale alla separazione delle proteine con massa molecolare compresa tra 30 e 150 kDa.

La soluzione del gel di acrilamide, detto anche gel di risoluzione (*resolving gel*) in cui avviene la separazione delle macromolecole, è stata fatta polimerizzare tra due lastre di vetro separate da spaziatori di nylon (0.75 mm) collocate sull'apposito apparecchio (*Mighty Small II SE 250*, Hoefer, Hoefer, Inc. Holliston, MA, USA). Dopo la polimerizzazione, sul gel di risoluzione si applica la soluzione del gel d'impaccamento (*stacking gel*), sottile strato di gel a maglie più larghe, ottenuto facendo polimerizzare l'acrilamide al 5% in tampone Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, con 0.75 g di saccarosio. La sua funzione è quella di permettere l'impaccamento delle proteine in una zona sottile sopra il gel di risoluzione, favorendone così un miglior ingresso e successiva separazione nel gel di risoluzione. Nello *stacking gel* si pone un "pettine" di teflon dello stesso spessore degli spaziatori, che, successivamente alla solidificazione dello *stacking gel*, viene rimosso permettendo la formazione di pozzetti in cui caricare i campioni.

Il volume del campione e la quantità di proteine caricate nei pozzetti dipende dalle specifiche sperimentali in funzione delle quali viene scelta anche la dimensione dei pozzetti nello *stacking gel*. Nei nostri esperimenti, i campioni sono stati solubilizzati in una soluzione tampone (*sample buffer*) costituita da Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, SDS al 4% e glicerolo al 20%. Le corse elettroforetiche sono state eseguite a corrente costante di 25 mA, con sistema di raffreddamento ad acqua, per i gel al 10% di poliacrilamide e a voltaggio costante (125 V) per i gel in gradiente. La presenza di una soluzione tampone (*running buffer*), costituita da Tris-HCl 25 mM, glicina 0.2 M, SDS 0.1%, pH 8.8, messa nelle vaschette superiore ed inferiore dell'apparecchio, in contatto con

Metodi

entrambe le estremità del gel, garantisce la continuità elettrica e favorisce il movimento delle specie molecolari.

Per seguire visivamente la corsa elettroforetica, è stato aggiunto alla soluzione dei campioni un tracciante colorato di massa inferiore a quella delle molecole del campione che quindi migra più velocemente delle specie proteiche all'interno del gel. La corsa elettroforetica viene infatti fermata quando la banda colorata del tracciante raggiunge la parte inferiore del gel e comincia ad eluire nella vaschetta inferiore dell'apparecchio elettroforetico. Allo scopo, noi abbiamo utilizzato come tracciante l'Orange G sciolto in glicerolo al 70% e unito al *sample buffer*.

2.3 Western Blotting

Anche se la PAGE è una delle tecniche più utilizzate per l'analisi e la caratterizzazione di miscele proteiche, essa tuttavia offre informazioni limitate al PM e pI dei singoli componenti proteici. Informazioni dettagliate sulla natura delle proteine possono essere invece ottenute mediante trasferimento elettrico delle singole proteine separate nel gel su di una membrana porosa di materiale opportuno, normalmente nitrocellulosa o polivinildifluoruro, sulla quale si procede alla rilevazione immunologica (*Immunoblotting* o *Western Blotting*).

Il *Western blotting* rappresenta una metodica specifica e altamente sensibile che si basa sul riconoscimento da parte degli anticorpi (Ac) di specifici determinanti antigenici proteici (Timmons TM, 1990). Gli Ac diretti contro le proteine d'interesse (detti Ac primari) riconoscono su di esse degli epitopi o sequenze segnale (*tag*) sulla proteina stessa. Gli Ac sono ottenuti immunizzando animali diversi con l'immunogeno proteico, costituito da una proteina intera o da porzioni specifiche di essa e possono essere policlonali, quando prodotti da più cloni di plasmacellule (riconoscendo in tal modo più epitopi dello stesso antigene), o monoclonali, quando prodotti da un solo clone di cellule (riconoscendo un solo epitopo dell'antigene). La metodica del *Western blotting* prevede che dopo la corsa elettroforetica su gel di acrilamide il gel venga montato su un apposito apparecchio a contatto con una membrana, di natura e porosità diverse, su cui le proteine sono trasferite mediante applicazione di un campo elettrico trasversale. Dopo il trasferimento, la membrana è immersa in una soluzione proteica che blocca tutti i siti d'interazione idrofobica presenti sulla membrana e successivamente incubata con una soluzione di Ac primari. Per visualizzare l'interazione immune fra antigene proteico e

Ac specifico, la membrana è incubata con una soluzione di Ac secondari, in grado di riconoscere la porzione costante dell'Ac primario, coniugati con un enzima che catalizza la reazione di precipitazione di un prodotto cromogenico in presenza di un substrato solubile. Gli Ac secondari sono IgG purificate su colonne di affinità e marcate in modo da poter essere identificate dopo il legame all'Ac primario. La reazione antigene-Ac viene evidenziata dalla precipitazione del prodotto insolubile colorato.

Nei nostri esperimenti è stata usata una membrana idrofobica di polivinildifluoruro (PVDF, Immobilon-P Millipore, Bellerica, MA, USA) con porosità di 0.45 μm (utile per *Western blotting* di proteine con massa superiore a 10 kDa e con caratteristiche di idrofobicità). Prima dell'uso, la membrana è stata immersa per alcuni secondi in metanolo, quindi dopo un lavaggio accurato in acqua, è stata lasciata in tampone di trasferimento (Tris-HCl 25 mM, Glicina 0.2 M, pH 8.4) per 15 min. Dopo la corsa elettroforetica il gel è stato equilibrato con il tampone di trasferimento per 15 min. Quindi è stato posto sulla membrana e racchiuso in un *sandwich*, costituito da fogli di carta da filtro impregnati di tampone, chiuso tra due lastre di plastica perforata e montato sull'apparecchio del *blotting* riempito di liquido di trasferimento. Applicando un campo elettrico attraverso il *sandwich*, le proteine vengono trasferite dal gel alla membrana. Il trasferimento è stato condotto a corrente costante di 230 mA per 2 h a 4 °C. Quindi il *sandwich* è stato smontato ed il gel colorato per verificare il completo trasferimento delle proteine. La membrana con le proteine d'interesse è stata incubata con una soluzione bloccante di latte al 10% in tampone Tris con NaCl (TBST, Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,1%, pH 7.5) per 1 h a temperatura ambiente e in lieve agitazione. Dopo una serie di lavaggi con tampone TBST la membrana è stata incubata *over night* a 4 °C ed in leggera agitazione con la soluzione contenente l'Ac primario. La mattina successiva l'eccesso di Ac primario è stato eliminato con una serie di lavaggi con TBST. Per la rivelazione delle bande positive per le specifiche proteine la membrana è stata incubata, per 1 h a temperatura ambiente e in leggera agitazione, con Ac secondari coniugati con AP o con HRP. Nel primo caso, prima dello sviluppo, la membrana è stata nuovamente lavata con TBST e poi messa in tampone Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 9.5, per 5 minuti per attivare la fosfatasi alcalina, mentre con Ac coniugati all'HRP si è proceduto direttamente allo sviluppo.

Per aumentare la sensibilità del sistema di rivelazione ed evidenziare proteine presenti in concentrazioni molto basse, è stato adottato il sistema di rivelazione a tre passaggi (*ABC System*), che prevede l'utilizzo di Ac secondari coniugati alla biotina. La biotina è

Metodi

una vitamina a basso peso molecolare (vitamina H) in grado di legare fortemente l'avidina dell'uovo (costante di dissociazione $K_D=10^{-15}M$). Poiché da 3 a 6 molecole di biotina possono legare una singola molecola di Ac formando legami covalenti con i gruppi aminici delle lisine, più molecole di avidina possono legarsi ad una singola molecola di Ac biotinilato. Inoltre, dato che una molecola di avidina è in grado di legare quattro molecole di biotina con interazioni di tipo irreversibile, utilizzando gli Ac secondari biotinilati e aggiungendo al sistema l'avidina, a sua volta coniugata con il sistema di rivelazione, si ottiene una intensificazione del fenomeno di rivelazione. L'utilizzo del metodo ABC nei nostri esperimenti di *Western blotting* prevedeva che dopo l'incubazione con la soluzione di blocco, e con l'Ac primario, la membrana fosse trattata con la soluzione dell'Ac secondario coniugato alla biotina. Dopo una serie di lavaggi con TBST, la membrana è stata incubata, a temperatura ambiente e in lieve agitazione per 45 min, con una soluzione contenente l'avidina coniugata all'enzima. Il segnale è stato rilevato utilizzando un substrato chemiluminescente con il sistema di rivelazione Novex AP (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) nel sistema con AP o con ECL Fast Pico (Immunological Sciences, Roma, Italia) nel sistema con HRP. La chemiluminescenza è una reazione chimica che genera energia rilasciata sotto forma di luce e dopo 2-3 minuti d'incubazione a temperatura ambiente con il substrato la membrana è stata messa fra due fogli trasparenti ed inserita nella camera oscura dello strumento per la rilevazione del segnale chemiluminescente (VersaDoc Imaging System, Bio-Rad). Dopo ogni immuno-blotting la membrana è stata lavata con TBST e trattata con tampone di *stripping* (Glicina 25 mM, SDS 1% pH 2,0) per 30 minuti sotto agitazione, seguita da ulteriori lavaggi con TBST per circa 1 ora. Il trattamento dello *stripping* è effettuato per allontanare gli Ac secondari e primari della precedente reazione senza asportare le proteine del campione che possono essere riesposte al trattamento con un altro Ac primario, per rilevare la presenza di proteine di natura diversa.

2.4 MISURAZIONE DELL'ATTIVITÀ PROTEOLITICA

2.4.1 Zimografia

Questo tipo di saggio è ampiamente utilizzato per studiare gli enzimi di degradazione delle matrici extracellulari (ECM), in particolare quelli della famiglia delle *Matrix*

metalloproteases (MMPs). Le MMPs sono endopeptidasi zinco- dipendenti capaci di degradare la matrice extracellulare. La zimografia è una tecnica elettroforetica particolare condotta in condizioni denaturanti (SDS) in cui la poliacrilamide è fatta co-polimerizzare con un substrato di gelatina per poter rilevare l'attività proteolitica dei campioni (Biro A, 2003; Rangan SK, 2003). Per il nostro scopo, i campioni sono stati caricati su gel di poliacrilamide al 10% co-polimerizzato con gelatina (0.8 mg/ml) e la corsa è stata effettuata in *running buffer* per circa 30 min a 25 mA. Dopo la corsa, il gel è stato lavato ripetutamente con una soluzione di Triton X-100 al 2.5%, per eliminare l'SDS, ed è stato incubato per una notte a 37 °C in una soluzione tampone (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 10 mM pH 7.4) che promuove l'attività della proteasi. Il gel è stato poi colorato con *Coomassie brilliant blue* e successivamente decolorato con una soluzione di acido acetico (7.5%) e metanolo (5%) in acqua distillata fino alla comparsa di bande chiare (segno dell'avvenuta digestione della gelatina) su sfondo blu omogeneo della gelatina non digerita.

3 ESPERIMENTI SU COLTURE CELLULARI

3.1 *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs)

3.1.1 Coltura e trattamento delle HUVECs

Per i nostri esperimenti sono state utilizzate colture primarie di HUVECs, cellule endoteliali prelevate dalla vena ombelicale di cordoni ombelicali umani. Le cellule sono state isolate secondo il metodo modificato di Jaffe (Jaffe EA, 1973) e sono state coltivate su piastre Petri con diametro di 6 cm, in terreno EBM (Lonza Waskerville, Inc. Waskerville, MD) con aggiunta di siero fetale bovino (FBS) al 10%, antibiotici all'1% (0.1 mg/ml di streptomina e 100 unità/ml di penicillina) e fattori di crescita (0.1% di rHEGF, 0.1% di idrocortisone ed estratto di cervello bovino, BBE allo 0.4%). Sono state utilizzate colture di HUVECs dal 2° al 6° passaggio, ottenute da un *pool* di 3-4 vene ombelicali, allo scopo di ridurre la variabilità inter-individuale. I passaggi di coltura sono stati effettuati staccando le cellule sub-confluenti dal supporto plastico con una soluzione di tripsina allo 0.05% ed EDTA allo 0.2% in tampone fosfato (PBS 6.7 mM, pH 7.2-7.4), dopo aver rimosso il terreno di coltura e lavato il monostrato cellulare

Metodi

con PBS. Negli esperimenti finalizzati alla misura degli effetti delle IgG purificate dal *pool* di plasmidi umani, le cellule sono state seminate in piastre da 12 pozzetti ad una densità di 125.000 cellule/ml (250.000 cellule per pozzetto) in terreno EBM con FBS al 10%, e lasciate aderire in incubatore a 37 °C per una notte. Il mezzo di coltura è stato quindi sostituito con terreno di coltura fresco senza siero, e le cellule lasciate in quiescenza per 4-5 h. Dopo aver nuovamente eliminato il terreno e sostituito con altro terreno fresco con siero all'1%, si è proceduto all'incubazione delle cellule con il trattamento per tempi diversi (1.5, 3.0, 5.0 e 20 h).

In particolare, le modalità di trattamento seguite sono state le seguenti:

- “trattamento continuo”, in cui le IgG aggiunte al terreno sono rimaste continuativamente in incubazione con le cellule per i tempi indicati sopra;
- “trattamento discontinuo”, in cui le IgG aggiunte al terreno sono rimaste in incubazione con le cellule per un tempo più breve (3 o 5 h, in funzione della tipologia di esperimento) rispetto al tempo d'incubazione finale. La procedura prevede che, ai tempi stabiliti le IgG siano rimosse con la rimozione del terreno, che viene sostituito con terreno fresco e l'incubazione protratta ulteriormente (fino a 20 h).

Alla fine di ogni incubazione, le HUVECs sono state visualizzate con un microscopio ottico per valutare la morfologia cellulare; il terreno (media) raccolto per procedere alla sua analisi attraverso saggi enzimatici (zimografia) e di espressione proteica (*Western blotting*) e i lisati cellulari raccolti per valutare l'espressione genica e proteica. Si sono inoltre eseguite analisi d'immunofluorescenza in cui si è valutata l'espressione e la localizzazione delle proteine.

Alla fine di ogni incubazione con e senza trattamento, le cellule sono state analizzate al microscopio ottico a contrasto di fase (Leyca DMI 4000B, equipaggiato con telecamera DFC 480), per valutarne la morfologia ed effettuare acquisizioni dei diversi quadri morfologici a più ingrandimenti.

3.1.2 Tests di vitalità cellulare e proliferazione

3.1.2.1 Saggio di esclusione del *Trypan blue*

Il test di vitalità cellulare con il colorante *Trypan blue* si basa sul principio di una diversa permeabilità al colorante della membrana cellulare in funzione dello stato di integrità o meno della cellula. In condizioni d'integrità, la cellula non consente il passaggio di molecole grandi e polari, per cui il colorante viene escluso, mentre le

cellule con membrana danneggiata risultano colorate per l'incorporazione della molecola. Le cellule vive, che assumono una colorazione blu-viola, possono quindi essere facilmente distinte al microscopio ottico rispetto a quelle con membrana danneggiata.

Per la misura della vitalità cellulare, si è proceduto nella seguente maniera: dopo l'incubazione in presenza e assenza del trattamento (IgG alle concentrazioni specificate in seguito), le cellule sono state lavate con PBS e staccate con la soluzione di tripsina/EDTA. La tripsina è stata poi inattivata con FBS. La sospensione cellulare è stata raccolta in provette da 1.0 ml da cui è stata poi prelevata un'aliquota per il test di vitalità cellulare. A questa aliquota della sospensione cellulare (40 µl) è stato aggiunto un eguale volume della soluzione allo 0.4% di *Trypan blue* (Appli Chem GmbH, Gatersleben) in PBS. Dopo circa 5 min, tempo necessario al colorante per permeare le cellule con membrana danneggiata, le cellule sono state contate al microscopio ottico a contrasto di fase (Olympus T041), inserendo due aliquote (da 20 µl ciascuna) della soluzione su entrambi i reticoli della camera conta-globuli di Bürker. Le cellule con membrana danneggiata diventano blu-viola, mentre quelle integre appaiono traslucide al microscopio ottico. Sono state contate tutte le cellule vive presenti all'interno dei due reticoli di conta. Quindi, per ottenere il numero complessivo di cellule presenti nella sospensione (N) è stata applicata la seguente formula:

$$N = \frac{(n_1 + n_2) \times V}{v}$$

dove n_1 e n_2 rappresentano il numero di cellule che si contano nei due reticoli della camera, mentre V è il volume iniziale della sospensione cellulare e v è il volume dei due reticoli di conta (1.8 µl).

3.1.2.2 Saggio di proliferazione

Per misurare la proliferazione delle HUVECs abbiamo applicato il saggio colorimetrico dell'MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (Mosmann T, 1983). La metodica sfrutta la capacità della deidrogenasi mitocondriale di scindere l'anello tetrazolico dell'MTT in un sale di formazano violaceo. La conversione avviene solo nelle cellule vive e la quantità di formazano prodotta è proporzionale al numero di cellule vitali. I cristalli disciolti in 2-propanolo·HCl danno una soluzione viola che assorbe a 570 nm. Il valore dell'assorbanza a questa lunghezza d'onda dà quindi una stima della vitalità cellulare.

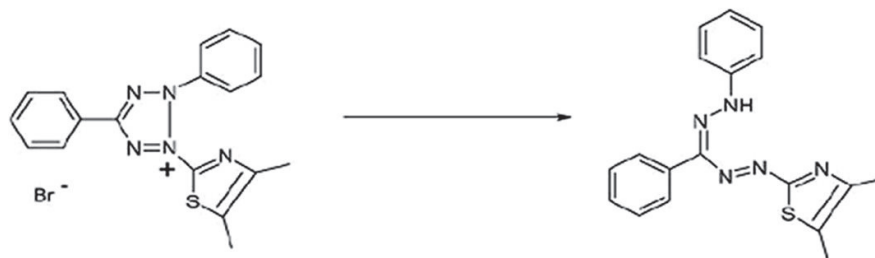


FIGURA 14. Riduzione di 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) a formazano.

Per la misura della proliferazione, le HUVECs sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla densità di 75000 cellule/ml, in terreno con FBS al 10% ed antibiotici all'1%. Sia per i controlli che per ogni trattamento (IgG alla concentrazione di 0.5 mg/ml a tempi diversi di incubazione, con e senza cambio di terreno) l'analisi è stata condotta in quadruplicato. Dopo l'incubazione, in ogni pozzetto sono stati aggiunti 20 μ l di soluzione di MTT (5 mg/ml in PBS). Dopo un'ulteriore incubazione di 4 h a 37 °C il supernatante è stato eliminato e i cristalli formati e depositati sul fondo dei pozzetti, sono stati disciolti con 100 μ l di soluzione di 2-propanolo·HCl. La lettura dell'assorbanza è stata effettuata su lettore di piastre (VICTOR², Wallac, Turku, Finland) alle lunghezze d'onda di 570 e 630 nm e i valori di proliferazione sono stati espressi come differenza di assorbanza (Assorbanza a 570 nm – Assorbanza a 630 nm).

3.1.3 Analisi dell'espressione proteica su lisati cellulari

L'analisi dell'espressione proteica sui lisati delle HUVECs è stata condotta allo scopo di capire se a seguito del trattamento potessero essere attivate delle vie di segnale cellulari coinvolte nei processi di proliferazione e differenziamento cellulare. A tale scopo, dopo l'incubazione stabilita, il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule lavate con PBS e poi staccate dal supporto mediante azione meccanica (*scraping*). Quindi sono state centrifugate per 10 min a 1500 rpm in centrifuga (Microfuge 22R Centrifuge, Beckman Coulter, Brea, California, USA). Dopo l'eliminazione del supernatante e un successivo lavaggio con PBS, le cellule sono state lisate in tampone di lisi, costituito da 6 volumi di tampone Laemmli (Tris-HCl 50 mM, pH 8.9, EDTA 5 mM, glicina 380 mM, SDS 2%) e 1 volume della soluzione di inibitori di proteasi

preparata in acqua secondo le istruzioni fornite dalla ditta (Roche). Per la misura dell'espressione proteica i lisati sono stati analizzati sia in SDS-PAGE su gel di acrilamide sia al 10% che in gradiente (4-20%). La corsa elettroforetica e il *Western blotting* sono stati eseguiti come specificato ai punti 2.1 e 2.2. I lisati sono stati analizzati in *Western blotting* per valutare la positività delle seguenti proteine: MEK/ERK 1/2, nella forma totale e fosforilata, Akt, nella forma totale e fosforilata, MMP-9, *Heat Shock Protein* (HSP) HSP40, HSP70 e HSP90 e gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) per normalizzare l'espressione delle proteine analizzate sul quantitativo proteico totale dei campioni. Inoltre, i lisati cellulari delle colture in cui il trattamento con le IgG umane prevedeva il cambio di terreno (trattamento discontinuo) sono stati analizzati anche per IgG, FcRn, Fab e Fc.

3.1.4 Real-Time PCR

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*), tecnica scoperta da Kary Mullis nel 1983, è un metodo di amplificazione *in vitro* di uno specifico frammento di DNA o cDNA (RNA restrotrascritto). Questa tecnica si basa sulla capacità della DNA polimerasi di sintetizzare un nuovo filamento di DNA complementare al filamento templatato. Un requisito indispensabile per il realizzarsi della reazione è la conoscenza delle estremità bersaglio, a cui i *primers*, due oligonucleotidi corti, a singolo filamento, si legano nel momento in cui vi è la denaturazione della doppia elica di DNA. La reazione della PCR prevede il susseguirsi di cicli di amplificazione durante i quali ci sono diverse temperature che rendono possibile: 1) la denaturazione della doppia elica di DNA in due singole eliche, alla temperatura di 95 °C; 2) l'appaiamento degli inneschi oligonucleotidici (*primers*) alle sequenze di DNA a singola catena complementari a essi e localizzati alle estremità del frammento bersaglio, alla temperatura di solito compresa tra i 50 e i 70°C; 3) l'estensione degli inneschi mediante aggiunta di nucleotidi nella direzione 5' → 3' ad opera della DNA polimerasi, che porta alla sintesi di una nuova elica complementare al DNA templatato, ad una temperatura compresa tra i 68 e i 72°C. A ogni ciclo il numero di copie di DNA aumenta in modo esponenziale, cioè il numero si duplica fino al raggiungimento di un *plateau*. Tutto il processo non può essere condotto con la DNA-polimerasi umana che è distrutta alle temperature della denaturazione, quindi nel 1988 fu isolata una DNA polimerasi termostabile prodotta dal batterio *Thermophilus aquaticus*, la Taq DNA polimerasi. L'enzima è costituito da una singola catena polipeptidica, con una massa molecolare di 94 kDa. Per l'attività della

Metodi

DNA polimerasi è necessaria, oltre ai *primers*, la presenza degli ioni magnesio (Mg^{2+}) e dei desossiribonucleotidi trifosfato che andranno a costituire il nuovo filamento di DNA. La reazione della DNA polimerasi prevede la formazione del legame fosfodiesterico fra un terminale 3'-OH di un nucleotide d'innescio e il fosfato α sul 5'-trifosfato di un nucleotide libero (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), con rilascio di pirofosfato (PPi). L'enzima segue le regole di complementarità fra le basi (Adenina-Tirosina/Citosina-Guanina).

A differenza della PCR tradizionale, che consente di visualizzare il prodotto di amplificazione solo alla fine del ciclo di amplificazione, la PCR in tempo reale (*real time*) ha il vantaggio di poter monitorare il prodotto di amplificazione dopo ogni ciclo di amplificazione con un'analisi dei dati più accurata e precisa. A questo scopo, nella PCR *real time* oltre ai *primers* specifici viene utilizzata una sonda fluorescente (SYBR-Green) che si lega al doppio filamento del prodotto di amplificazione della sequenza oligonucleotidica (circa 300bp) del gene di interesse. I valori di fluorescenza emessi dalla sonda fluorescente vengono registrati durante ogni ciclo del processo di amplificazione. Ne consegue che il segnale di fluorescenza è direttamente proporzionale alla concentrazione di DNA che corrisponde al valore del ciclo soglia definito *Threshold Cycle* (Ct). Nella reazione di PCR Real-Time, monitorata in tempo reale per 40 cicli, si ottiene una curva sigmoidale dove i primi 10-15 cicli corrispondono a valori di fluorescenza dati dal rumore di fondo (*background*), poi tra i 15-25 cicli la reazione ha un andamento esponenziale per poi flettere e raggiungere il *plateau* (30-40 cicli). Il valore di Ct, utilizzato per quantificare il prodotto della reazione di PCR, corrisponde al valore di Ct dove l'aumento di fluorescenza risulta essere significativamente maggiore a quello del livello basale (*background*) misurato nei primi cicli di amplificazione. L'eccitazione del SYBR-Green avviene a 497 nm, e si vede il suo picco di emissione a 520 nm. Per poter ottenere il DNA su cui poi si applica l'analisi di PCR si deve estrarre l'RNA dalle cellule, che verrà poi retro-trascritto a cDNA.

3.1.4.1 Estrazione dell'RNA totale

L'RNA totale è stato estratto dalle HUVECs usando il kit RNeasy Mini (Qiagen Sciences Germantown, MD, USA). Tale kit è costituito da una colonnina con una matrice a base di silice (colonna *RNeasy Mini spin*) che consente la purificazione specifica dell'RNA, e da una serie di tamponi per l'eluizione e i lavaggi della colonna. Le cellule sono lisate in presenza di un tampone contenente guanidina tiocianato ad

elevata concentrazione (tampone RLT) che consente la denaturazione e la conseguente inattivazione delle ribonucleasi (RNasi), enzimi che denaturano l'RNA, garantendo così un'elevata purificazione di RNA intero. Prima di caricare il campione alla colonna, viene aggiunto etanolo ad un rapporto di 1:1 (v:v) per fornire un'adeguata condizione di legame. Il campione viene, quindi, caricato sulla colonnina alla cui matrice di silice si lega solo l'RNA presente nel campione. Vengono quindi effettuati dei lavaggi con dei tamponi contenenti etanolo per eliminare il materiale legato in modo aspecifico alla colonna. L'RNA può essere quindi recuperato effettuando un'eluizione con acqua sterile. Tutte le procedure di lavaggio e successivo recupero del materiale sono effettuate mediante cicli di centrifugazione a 8000×g.

Per i nostri esperimenti, le HUVEC, sono state seminate in piastre da 12 pozzetti ad una densità di 250.000 cellule/ml e lasciate aderire in incubatore a 37 °C per una notte. La mattina seguente il terreno è stato sostituito con terreno fresco senza siero e le cellule lasciate in quiescenza per 5 ore. Poi sono state aggiunte le IgG (0.5 mg/ml) in terreno con 1% FBS, e l'incubazione è stata protratta per 20 h ("trattamento continuo"). Per il "trattamento discontinuo", si è proceduto al cambio di terreno dopo 5 h di incubazione con le IgG, lasciando poi le cellule in ulteriore incubazione senza trattamento fino a 20 h totali. Alla fine del tempo d'incubazione, le cellule sono state lisate aggiungendo 300 µl del tampone RLT, e il lisato cellulare sottoposto ad agitazione con l'utilizzo di un *vortex* per ottenere una soluzione omogenea conservata poi a -20 °C. Per isolare l'RNA si è seguito il metodo descritto nel kit, aggiungendo al lisato 350 µl di etanolo al 70% e mescolando delicatamente con una pipetta. Si è quindi assemblata la colonnina al di sopra del tubo di raccolta (fornito nel kit) e si è aggiunta la miscela lisato-etanolo nella colonnina che è stata centrifugata a 8000×g per 150 sec. I lavaggi sono stati effettuati con 700 µl di tampone RW1 e successivamente con 500 µl di tampone RPE per due volte. Ad ogni lavaggio si sono effettuati cicli di centrifugazione per 15 sec a 8000×g e la soluzione accumulata nel tubo di raccolta è stata scartata. L'ultimo lavaggio è stato effettuato per un tempo più prolungato (2 min) per eliminare l'etanolo residuo in colonna. Infine la colonnina filtrante è stata posizionata al di sopra di un nuovo tubo di raccolta e sono stati aggiunti 40 µl di acqua priva di RNasi (0,01% dietilpirocarbonato, DEPC). La centrifugazione è stata condotta per 1 min a 8000×g ed in questo modo è stato recuperato l'eluato contenente l'RNA.

3.1.4.2 Quantificazione spettrofotometrica dell'RNA

La determinazione della concentrazione di RNA ottenuto e il suo grado di purezza sono stati determinati mediante lettura dei valori di assorbanza ottenuti utilizzando il NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) alle lunghezze d'onda di 260 nm e 280 nm. L'assorbanza dei campioni di RNA a 260 nm e 280 nm ed il loro rapporto A260/A280 è stato utilizzato per valutare la purezza del campione. Il valore di assorbanza a 260 nm permette di quantificare l'RNA totale estratto, mentre il rapporto A260/A280 indica il grado di purezza del campione. Lo strumento calcola direttamente la concentrazione del campione e il rapporto tra A260/A280.

3.1.4.3 Retro-trascrizione dell'RNA totale e sintesi del cDNA

La reazione di retro-trascrizione (RT) è impiegata per sintetizzare una molecola di DNA a singolo filamento (cDNA) complementare all'RNA template, mRNA, utilizzando l'enzima DNA polimerasi RNA dipendente (trascrittasi inversa).

L'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA usando il kit cDNA Synthesis iScript (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA), che contiene già tutti i componenti per eseguire la reazione, come i precursori deossiribonucleotidici trifosfato (dNTP) e gli ioni Mg^{2+} . L'iScript è un enzima che procede alla reazione di trascrizione inversa e ha una notevole stabilità termica. L'enzima viene fornito pre-miscelato con un inibitore per l'RNasi H, una ribonucleasi che catalizza l'idrolisi dell'RNA.

Per le nostre analisi si è retro-trascritto 1 μ g di RNA estratto dalle cellule in cDNA. I componenti per eseguire la retro-trascrizione sono stati aggiunti in una provetta priva di nucleasi: la miscela di reazione è costituita da una miscela di reagenti iScript 5x, acqua priva di nucleasi e l'enzima trascrittasi inversa iScript. La reazione di RT deve essere condotta in una prima fase a 25 °C per 5 min, seguita da un'incubazione a 42 °C per 30 min (per attivare la trascrittasi inversa), e da una successiva fase a 85 °C per 5 minuti (per inattivare la trascrittasi inversa). Alla fine i campioni vengono tenuti a 4 °C fino a quando non vengono tolti dallo strumento. Il cDNA è stato poi conservato a -20 °C fino al momento dell'utilizzo.

3.1.4.4 PCR Real-Time Quantitativa

Dopo aver ottenuto il cDNA, attraverso la retro-trascrizione, lo si può amplificare attraverso la metodica della PCR *real time*. Per amplificare il cDNA è necessario conoscere le sequenze oligonucleotidiche dei *primers* del gene d'interesse e anche del

gene di controllo *housekeeping* (β -actina). I *primers* per il nostro gene di interesse sono state ottenute dalla letteratura (Zhao Y, 2011) e controllate nuovamente utilizzando i programmi Primer3 e Operon. La specificità dei *primers* è stata verificata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio e con l'analisi della curva di *melting* che consente di stabilire la temperatura alla quale metà delle molecole complementari sono ibridate. La curva di *melting* inoltre consente di verificare l'eventuale presenza di dimeri dei *primers* o la presenza di prodotti aspecifici nella reazione di PCR. Dopo avere verificato che la scelta dei *primers* è stata ottimale, sono state fatte delle curve di calibrazione per ciascun gene a concentrazioni scalari (diluizione 1:2) di RNA totale. Questo ha permesso di stabilire l'efficienza della reazione di PCR che deve essere all'incirca del 100%. Mediante la curva di calibrazione (Figura 15) sono stati ottenuti i valori di pendenza (*slope*), la intercetta della retta di regressione (R), e il coefficiente di correlazione dei punti. Il valore della pendenza viene poi utilizzato per calcolare l'efficienza della reazione di PCR secondo la formula: $E(\text{eff}) = 10^{-1/\text{slope}}$.

La valutazione dell'espressione del gene d'interesse è relativa, in quanto viene calcolata mediante normalizzazione di un controllo endogeno rispetto ad un campione di riferimento (*housekeeping*, β -actina) applicando la formula matematica $2^{-\Delta\Delta C_t}$; dove 2 si trova attraverso la derivazione matematica della formula e $-\Delta\Delta C_t = [(C_t(\text{IgG di un campione}) - C_t(\beta\text{-actina di un campione})) - [(C_t(\text{IgG di un normalizzatore}) - (C_t(\beta\text{-actina di un normalizzatore}))]$. Per normalizzatore si definisce un campione il cui valore di espressione corrisponde a 1.

La reazione di PCR Real-Time è stata condotta utilizzando il Kit SsoFast Eva Green Supermix (Biorad) e i *primers* specifici per il nostro gene di interesse, IGHG1 (*forward* 5'-act ggc tga atg gca agg ag-3' e *reverse* 5'-ttc tat ccc agc gac atc gcc-3') e per il gene *housekeeping* β -actina (*forward* 5'-ccg cga gta caa cct tct-3' e *reverse* 5'-cgtcat cca tgg cga act-3'). La reazione è stata eseguita mediante l'utilizzo del sistema di rivelazione CFX96 REAL-TIME SYSTEM C1000 THERMAL CYCLER (BioRad) e condotta in 25 μ l finali contenenti la miscela di reazione EvaGreen 2x (BioRad), 50 nM *Forward primer*, 50 nM *Reverse primers*, 5 μ l cDNA e acqua priva di nucleasi. Il profilo termico della reazione prevede un ciclo di reazione a 95 °C per 3 min (attivazione dell'enzima Taq DNA polimerasi) e 39 cicli con 30 secondi a 60°C e 10 secondi a 95°C (fase di ibridizzazione ed estensione).

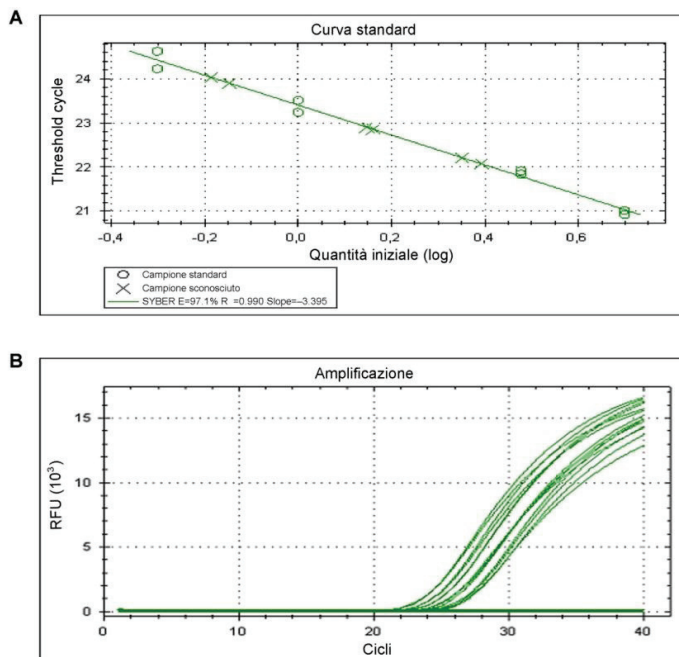


Figura 15. A) Curva di calibrazione a concentrazioni scalari di RNA totale, da cui si ottengono i valori di R (intercetta della retta di regressione) e *slope* (valori di pendenza). B) Tipica curva di amplificazione del nostro gene d'interesse.

3.1.5 Analisi di espressione proteica mediante immunofluorescenza

Per analizzare in dettaglio l'espressione e la localizzazione delle proteine, le cellule sono state analizzate mediante microscopia confocale. Tale tecnica rappresenta un'evoluzione della microscopia a fluorescenza che si basa sulla capacità di specie organiche e inorganiche di assorbire ed emettere luce. Alcuni materiali esaminati in microscopia sono auto-fluorescenti, mentre in altri casi per marcare cellule e tessuti sono utilizzati coloranti fluorescenti, chiamati fluorofori (o fluorocromi). Tali molecole sono coniugate ad anticorpi specifici che identificano la molecola di interesse (siano esse proteine o oligonucleotidi). Il campione viene investito da una luce alla lunghezza d'onda di eccitazione del fluoroforo, che assorbe la luce ed emette ad una lunghezza d'onda maggiore. Il raggio di luce emessa viene rilevato dall'occhio, attraverso il microscopio, così che le strutture fluorescenti rilevate risultano ad alto contrasto contro uno sfondo scuro. La microscopia confocale utilizza sorgenti di luce laser puntiformi, che illuminano singoli punti del campione. Ciò permette di ottenere immagini precise e dettagliate, derivate da ripetute acquisizioni a fuoco su piani verticali diversi eliminando

così l'interferenza della luce emessa da piani diversi di quello di messa a fuoco, problema della microscopia a fluorescenza tradizionale.

Nelle nostre analisi, 450.000 cellule in EBM con 10% FBS sono state seminate in piastre da 6 pozzetti, in cui sono stati depositati dei vetrini per l'adesione delle cellule. Dopo 5 h di quiescenza, il terreno è stato rimosso e sostituito con EBM fresco con 1% FBS; le cellule sono state quindi trattate con le IgG (0.5 mg/ml) ed incubate per 20 h a 37 °C. Dopo l'incubazione il terreno è stato rimosso, le cellule adese sui vetrini sono state lavate con PBS e fissate con metanolo 100% raffreddato a -20°C per 10 min a 4°C. Dopo tre lavaggi con PBS le cellule sono state permeabilizzate con una soluzione di saponina 0.5% in PBS a temperatura ambiente per 20 min. Dopo due lavaggi con PBS, le cellule sono state incubate per 30 min con una soluzione bloccante di BSA 1% in PBS. Alla fase di blocco sono seguiti tre lavaggi con PBS e l'incubazione dei vetrini per 1 h a 37 °C con gli Ac primari anti-IgG umani coniugati con Dylight 488 (diluizione 1:100 in PBS) e gli anti-actina (diluizione 1:500 in PBS). Dopo ulteriori lavaggi in PBS, l'actina è stata evidenziata mediante l'aggiunta di Ac secondari Cy3-coniugati (diluizione 1:500 in PBS). Dopo l'incubazione per 1 h a temperatura ambiente e successivi tre lavaggi in PBS, le cellule sono state trattate con RNasi (20 µg/ml in PBS) per 10 min a temperatura ambiente, allo scopo di digerire l'RNA. Dopo tre lavaggi in PBS e un lavaggio finale in acqua, che permette l'eliminazione dei sali del PBS, è stato effettuato il trattamento con ioduro di propidio per la marcatura dei nuclei ed è stata aggiunta una soluzione di Mowiol 40-88, polimero che facilita l'adesione del vetrino copri-oggetto senza interferire con il sistema ottico. Le immagini sono state acquisite con il microscopio a fluorescenza confocale NIKON C1, effettuando acquisizioni multiple su piani diversi lungo l'asse Z. Le immagini sono state elaborate con il software Image J 1.46r (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) utilizzando le funzioni Z Project, per ottenere la fusione dei segnali di fluorescenza dei piani multipli acquisiti nell'asse Z, e Orthogonal Views, per creare le proiezioni ortogonali negli assi YZ e XZ.

3.1.6 Analisi dei terreni di coltura cellulare

I mezzi di coltura delle HUVECs sono stati raccolti per l'analisi di proteine specifiche secrete in seguito al trattamento. Per rimuovere i detriti cellulari, i terreni sono stati prima centrifugati per 10 min a 800×g e poi sottoposti a dialisi contro acqua bidistillata per una notte a 4 °C per eliminare i sali presenti. Il materiale è stato liofilizzato e

Metodi

risospeso in 500 µl di *sample buffer* per l'analisi in SDS-PAGE (su gel in gradiente 4-20%) seguita da *Western blotting* per MMP-9, HSP70, HSP90 e IgG. Il materiale è stato utilizzato anche per le analisi di attività proteolitica su gel di gelatina (zimografia).

3.1.7 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

Oltre alle analisi di *Western blotting*, per ottenere una valutazione quantitativa della produzione di IgG secrete nei terreni di coltura delle HUVECs, è stato utilizzato il test ELISA, dosaggio immunoenzimatico che unisce la specificità degli anticorpi con la sensibilità di dosaggi spettrofotometrici di un enzima mediante l'uso di anticorpi o antigeni uniti ad un enzima facilmente dosabile (Wilson K, 1995). Esistono diverse procedure per questo tipo di tecnica: l'enzima può essere legato direttamente all'anticorpo primario che riconosce l'antigene, e si parla quindi di metodo diretto, oppure legato a una proteina come la streptavidina se l'anticorpo primario è coniugato alla biotina (metodo indiretto). Gli enzimi più comunemente utilizzati sono la perossidasi di rafano e la fosfatasi alcalina. Generalmente i test sono condotti in piastre di polistirene da 96 pozzetti, che legano in maniera passiva anticorpi o proteine. Il legame e l'immobilizzazione dei reagenti rendono il test estremamente versatile e semplice da realizzare.

Uno dei metodi più comunemente utilizzati nel test ELISA è il metodo a “*sandwich*”, così chiamato perché l'analita viene misurato tra due anticorpi, uno di “cattura” depositato sulla piastra e uno di rivelazione. Questo metodo prevede che il fondo del pozzetto della piastra sia saturato con un anticorpo specifico per l'antigene che vogliamo misurare e l'eccesso di anticorpo saturante viene eliminato con un lavaggio. S'introduce il campione con l'antigene che si vuole misurare in diverse diluizioni e l'antigene, se presente, si lega all'anticorpo. Si lava nuovamente per eliminare l'antigene in eccesso. Si aggiunge un anticorpo secondario, specifico, che va a legare il complesso antigene-anticorpo, e che è coniugato con un enzima. Aggiungendo il substrato di questo enzima si forma un prodotto colorato all'interno del pozzetto e successivamente si aggiunge la soluzione di blocco della reazione cromogena. La lettura quantitativa si effettua attraverso rivelazione della luce trasmessa, letta mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro ad una specifica lunghezza d'onda. La misura dell'assorbanza prodotta dalla reazione cromogena risulta essere proporzionale alla quantità di antigene legato e mediante una curva standard della proteina in esame a concentrazioni note è possibile determinare il quantitativo di antigene presente negli

analiti. Tale metodo è stato sfruttato nelle nostre analisi mediante l'utilizzo di un kit (ICL Labs, Portland, OR, USA). Questo kit è costituito da una piastra in cui è adsorbito l'anticorpo di cattura anti-IgG umane, un calibratore costituito da una soluzione di IgG umane (alla concentrazione di 6.075 mg/ml, da diluire a concentrazioni note per ottenere la curva di calibrazione), da una soluzione diluente (*running buffer*), una soluzione di lavaggio, un anticorpo coniugato all'enzima HRP, un substrato cromogeno TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) e una soluzione di blocco della reazione.

I nostri campioni da analizzare, preventivamente diluiti in PBS, sono stati aggiunti ai pozzetti e incubati per 2 ore a temperatura ambiente e in agitazione. Successivamente per rimuovere il materiale non legato alla piastra sono stati effettuati 3 lavaggi con PBS e sono stati aggiunti gli anticorpi secondari anti-IgG umane coniugati all'HRP. La piastra è stata incubata per 20 min a temperatura ambiente al buio, in agitazione. Dopo 3 lavaggi con PBS, ai pozzetti è stata aggiunta la soluzione del substrato cromogenico TMB con perossido di idrogeno in acido citrico pH 3.3. La piastra è stata incubata al buio per 10 min a temperatura ambiente e la reazione è stata quindi bloccata con una soluzione di acido solforico 0.3 M. La lettura dell'assorbanza è stata condotta a 450 nm su spettrofotometro VICTOR² (Wallac, Turku, Finland). Nei nostri test è stata costruita una curva standard di IgG a concentrazioni crescenti da 0 a 125 ng/ml, in doppio. I campioni da analizzare sono stati diluiti secondo tre rapporti di diluizione (1:25, 1:100, 1:500) e le letture sui campioni sono state effettuate in doppio. Mediante un'equazione polinomiale di 4° grado ottenuta dall'interpolazione dei valori di assorbanza dati dalle quantità note di IgG, è stato possibile risalire al quantitativo di IgG presente nei campioni.

3.2 Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)

3.2.1 Purificazione e coltura dei PBMCs

Allo scopo di analizzare gli effetti delle IgG sulle cellule dell'immunità adattativa, abbiamo utilizzato colture di PBMC, cellule mononucleate (linfociti B e T, monociti/macrofagi e cellule dendritiche) prelevate dal sangue periferico di donatori sani, dal Centro Trasfusionale dell'Ospedale di Padova. La separazione dei PBMC dal resto delle cellule del sangue è stata eseguita secondo il metodo di Bøyum (Boyum A, 1964), utilizzando una centrifugazione con *Ficoll-Paque* Plus, costituito dal

Metodi

polisaccaride Ficoll e da diatrizzato di sodio. Specificamente, il sangue preventivamente trattato con citrato di sodio come anticoagulante, è stato diluito con RPMI, stratificato sulla soluzione di *Ficoll-Paque* e centrifugato per 40 min a $600\times g$, in provette con fondo a U su centrifuga a rotore oscillante senza freno. La differenza di densità permette la migrazione e la separazione dei differenti tipi cellulari presenti nel sangue. In particolare, gli eritrociti sono completamente aggregati dal *Ficoll-Paque* e sedimentano sul fondo della provetta. Immediatamente sopra alla linea degli eritrociti si depositano i granulociti mentre le cellule mononucleate, a causa della loro bassa densità (<1.078 g/ml) si trovano all'interfaccia tra lo strato di plasma e RPMI, il terreno di coltura dei PBMCs, e lo strato di *Ficoll-Paque*, insieme ad altre particelle a bassa densità quali le piastrine.



Figura 16. Separazione dei PBMC utilizzando il gradiente di *Ficoll-Paque* Plus

I PBMC sono stati quindi recuperati con una pipetta Pasteur e sottoposti ad una serie di lavaggi con RPMI utili per l'eliminazione di piastrine, plasma e residui di *Ficoll-Paque*. Il primo lavaggio prevede la centrifugazione a $600\times g$ per 15 min, mentre nei due lavaggi successivi la centrifugazione è condotta a $300\times g$ per 10 min. I PBMC così ottenuti sono stati risospesi in RPMI e contati con il colorante di Türk, colorante specifico per la conta dei linfo-monociti, utilizzando il test di vitalità cellulare come effettuato con le HUVECs, ma effettuando diluizioni maggiori della sospensione cellulare (paragrafo 4.1.1.2.1 Saggio di esclusione del *Trypan blue*).

Successivamente alla conta, i PBMC sono stati seminati con una densità di 2.000.000 cellule/ml in piastra da 48 pozzetti, per l'analisi dei lisati cellulari, con terreno RPMI in presenza di FBS al 10% e di L-glutamina all'1%. Le cellule, seminate in doppio, sono

state incubate per 12 giorni a 37 °C in presenza e in assenza (controllo) di IgG alle concentrazioni di 0.2, 0.5 e 1.0 mg/ml. Oltre ai controlli in assenza di IgG, i PBMCs sono stati trattati con puromicina (100 µg/ml), per escludere una sintesi proteica non specifica (controllo negativo), o con PWM (diluizione finale 1:50), mitogeno che stimola in maniera aspecifica la proliferazione dei PBMCs e la produzione di anticorpi (controllo positivo).

Come nel caso delle HUVECs, così anche i PBMC sono stati sottoposti a due diversi tipi di trattamento:

- “trattamento continuo”, in cui le IgG aggiunte al terreno sono rimaste in incubazione con i PBMC per l’intera durata di 12 giorni;
- “trattamento discontinuo”, con cambio di terreno dopo 2 giorni di trattamento con le IgG e sostituzione con terreno fresco (senza trattamento) fino ai 10 giorni di incubazione.

Per il cambiamento del terreno i PBMC sono stati raccolti nel loro terreno di coltura da ciascun pozzetto e centrifugati a 2000 rpm per 5 min. Il terreno è stato quindi rimosso, sostituito con terreno fresco, senza IgG, e i PBMCs rimessi in coltura fino alla fine dei 12 giorni totali. Sia all’inizio sia alla fine del “trattamento continuo” è stata determinata la percentuale di linfociti CD19⁺.

L’analisi morfologica dei PBMCs è stata condotta dopo incubazione di 5 e 12 giorni con l’osservazione delle cellule nei singoli pozzetti al microscopio ottico (a contrasto di fase) e l’acquisizione di immagini di diversi campi cellulari a più ingrandimenti.

3.2.2. Saggio di proliferazione

Anche per i PBMC è stato utilizzato il saggio MTT per la valutazione della proliferazione. A questo scopo, i PBMC sono stati seminati in piastre di 96 pozzetti (200 µl/pozzetto), alla concentrazione di 500000 cellule/ml e incubati in presenza o assenza di IgG (0,5 mg/ml) per 2 giorni. Alla fine dell’incubazione sono stati aggiunti a ciascun pozzetto 20 µl di soluzione madre di MTT (5 mg/ml di MTT disciolti in PBS e poi filtrati). Dopo incubazione per 4 h a 37 °C, la piastra è stata centrifugata a 1800 rpm per 5 min, il supernatante è stato eliminato, e i cristalli di formazano depositati sul fondo sono stati disciolti in 100 µl di soluzione di 2-propanolo·HCl. La riduzione dell’MTT è stata quantificata misurando l’assorbanza a 570 nm e 630 nm e l’entità della proliferazione espressa come la differenza dei due valori di assorbanza a 570 e 630 nm. Gli esperimenti di proliferazione sono stati condotti tutti in quadruplicato.

3.2.3 Analisi dei lisati cellulari

Dopo la rimozione del supernatante, le cellule sono state raccolte e lavate due volte con PBS e lisate poi con il tampone di lisi (come per le HUVECs, paragrafo 4.1.1.3). I lisati sono stati sottoposti a bollitura per 8 min e analizzati in SDS-PAGE su gel di acrilamide sia al 10% (utilizzato per la preliminare valutazione del quantitativo di proteine da caricare su gel per gli esperimenti di *blotting*), che in gradiente (4-20%), specificamente usato per gli esperimenti di *Western blotting* per misurare l'espressione di una serie di proteine (HSP70, HSP90, IgG, IgM e FcRn).

3.2.4 Analisi dei terreni di coltura cellulare

Alla fine di ogni periodo d'incubazione i terreni sono stati raccolti per la determinazione della produzione di IgG e della secrezione di varie proteine. Per rimuovere i detriti cellulari, i terreni sono stati sottoposti a centrifugazione, 10 min a 800×g. Il materiale è stato analizzato mediante SDS-PAGE (su gel in gradiente 4-20%) seguita da *Western blotting* per l'analisi di proteine: MMP-9, HSP70, HSP90, IgM, IgG e FcRn.

3.2.5 ELISA

I terreni di coltura dei PBMC sono stati analizzati con il saggio ELISA per una determinazione quantitativa della secrezione di IgG, secondo la metodica illustrata nel paragrafo 4.1.1.7. In questo caso i terreni da analizzare sono stati diluiti secondo i rapporti 1:50, 1:250 e 1:1000.

4 ANALISI DEI DATI

I gel sono stati analizzati con il programma Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics, Rockville, MD, USA). Per quanto riguarda le misurazioni con metodo ELISA e le analisi PCR, i dati sono mostrati come media ± DS. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA). Il confronto tra controlli e trattati è stato effettuato applicando il test di Student (unpaired *t*-test) con livello di significatività di $p < 0.05$.

RISULTATI

1. EFFETTI DELLE IgG SULLE HUVECS

1.1 Modificazioni morfologiche

In una prima serie di esperimenti si è voluto saggiare l'effetto di concentrazioni scalari di IgG sull'aspetto morfologico delle HUVECs analizzate al microscopio ottico dopo 20 h di incubazione a 37 °C (secondo le modalità definite nei Metodi). Si è così potuto notare un evidente effetto di trasformazione simil-angiogenetica delle cellule in funzione della concentrazione delle IgG (Figura 17, A).

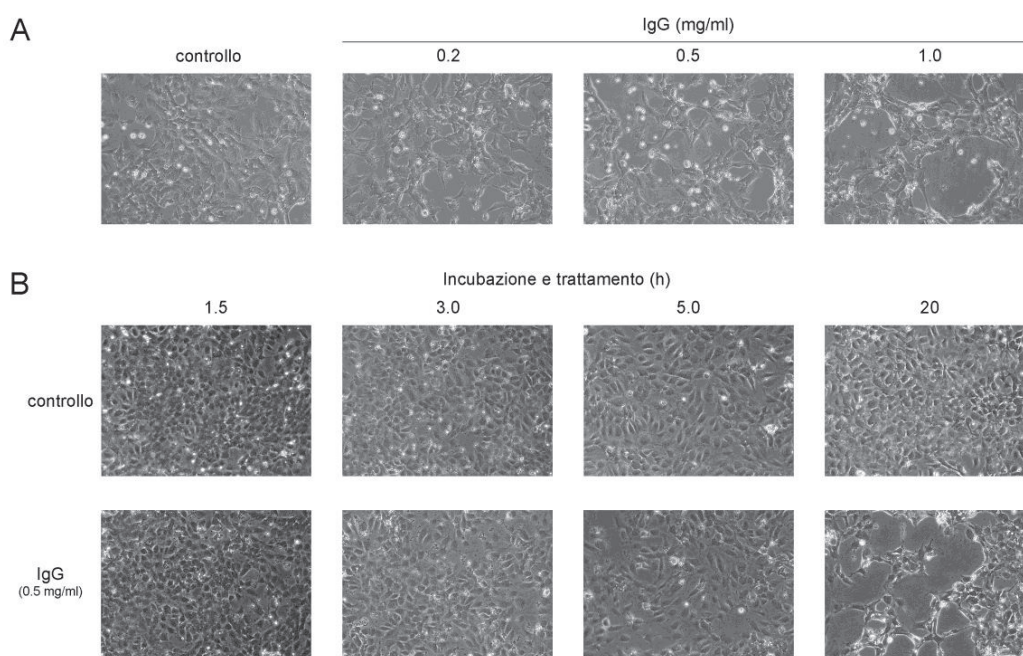


Figura 17. Modificazioni morfologiche indotte dalle IgG sulle HUVECs. Le cellule sono state coltivate come descritto nei Metodi e dopo la quiescenza, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno fresco con 1% di FBS a basso contenuto di IgG. Sono state seminate 250.000 cellule per pozzetto. **(A)** Alle cellule sono state aggiunte concentrazioni scalari di IgG e dopo incubazione di 20 h le cellule sono state esaminate al microscopio ottico. **(B)** Le IgG sono state aggiunte alla concentrazione di 0.5 mg/ml e le cellule sono state esaminate dopo incubazione di 1.5, 3.0, 5.0 e 20 h. Sia in (A) che in (B) i quadri morfologici sono rappresentativi di molti altri osservati nello stesso esperimento e in altri due esperimenti condotti in tempi separati. Ingrandimento di 10x.

Risultati

L'effetto era particolarmente marcato a 1 mg/ml IgG ma altrettanto significativo già a 0.5 mg/ml. Si è così scelta la concentrazione fissa di 0.5 mg/ml di IgG in tutti i successivi esperimenti.

Per valutare se vi era una dipendenza dal tempo di incubazione nella comparsa delle modificazioni morfologiche indotte da IgG, le HUVECs sono state analizzate dopo 1.5, 3.0, 5.0 e 20 h di incubazione. Mentre il controllo non subiva particolari cambiamenti ad ogni tempo di osservazione, con il trattamento già dopo 5 h si evidenziava la perdita della normale organizzazione a ciottolato (*"cobblestone"*) delle HUVECs che presentavano numerosi prolungamenti citoplasmatici che andavano a contornare alcuni spazi vuoti. Dopo 20 h di incubazione il ri-arrangiamento strutturale evolveva verso la formazione di vere e proprie cavità tubulari evidenti in tutti i campi di osservazione (Figura 17, B). Quindi, gli effetti osservati sulla morfologia cellulare erano dipendenti dalla concentrazione delle IgG come pure dal tempo di incubazione, iniziando a comparire dopo circa 5 h ed avendo la loro massima espressione dopo 20 h.

1.2 Effetti sull'espressione cellulare e secrezione di proteine di rilievo

Le significative modificazioni della struttura cellulare osservate al microscopio ottico suggerivano il coinvolgimento di proteine notoriamente implicate nei processi di proliferazione e differenziazione cellulare. E' risaputo, infatti, che nel processo di modificazione angiogenetica sono coinvolte, fra le altre molecole, alcuni importanti enzimi della matrice extra-cellulare come la metallo-proteasi 9 (MMP-9) e MMP-2, nonché alcune heat shock proteins (HSPs) che svolgono un ruolo di *"chaperones"* per proteine sia di secrezione che di struttura (Hartl FU, 1996). I risultati di precedenti lavori avevano dimostrato anche che alcune di queste HSPs, come HSP90 e HSP70, erano implicate attivamente nei processi di diffusione autocrina e paracrina del segnale di proliferazione e trasformazione delle HUVECs (Tramentozzi E, 2008). Sulla base di questi dati e tenendo conto che le modificazioni morfologiche osservate sulle HUVECs in presenza di IgG erano simili a quelle indotte da sostanze mitogeniche (Tramentozzi E, 2008), si è voluto indagare se le IgG potessero stimolare sia la proliferazione cellulare che l'espressione di specifiche HSPs e della MMP-9.

In tutti gli esperimenti allestiti allo scopo di misurare l'effetto proliferativo (vedi Metodi) trattando le cellule con 0.5 mg/ml di IgG a tempi di incubazione diversi (1.5, 3.0, 5.0 e 20 h), non si è mai rilevato un effetto stimolante da parte delle IgG (dato non

mostrato). La misurazione dell'espressione delle proteine di interesse condotta con metodo *Western blotting* sia sui lisati cellulari che sul terreno di coltura a tempi di incubazione diversi, ha dato invece risultati particolarmente interessanti (Figura 18). Per quanto riguarda i lisati cellulari, già dopo 1.5 h di incubazione, si è notato per ogni singola proteina la comparsa di bande nuove, non presenti nel relativo controllo, risultato della stimolazione da parte delle IgG di forme inducibili (Figura 18, A, frecce). Di particolare rilievo erano le forme inducibili di HSP70, HSP40 e HSP90, mentre le rispettive forme costitutive di queste HSPs non risultavano alterate rispetto al controllo. La misurazione a tempi diversi dell'espressione proteica nelle cellule permetteva di rilevare come l'effetto di stimolazione da parte delle IgG avesse il suo picco massimo dopo 5.0 h di incubazione, mentre l'effetto non subiva incrementi prolungando l'incubazione fino a 20 h. In tutti i *Western blotting*, poi, le proteine comparivano a pesi molecolari particolarmente elevati, superiori all'atteso, indicativi della formazione di complessi molecolari (sia omo- che etero-complessi), e solo nel caso di HSP70 e HSP90 si notava anche la banda relativa alla forma monomerica della proteina. Un'ulteriore prova della marcata alterazione strutturale subita dalle cellule in presenza di IgG era l'incremento di actina (dato non mostrato) che non poteva quindi essere presa come proteina di riferimento per la normalizzazione del carico di proteine nelle elettroforesi. Per questa ragione l'actina è stata sostituita dal GAPDH come proteina di controllo per la valutazione del caricamento proteico dei campioni nei gel di elettroforesi. Il GAPDH non subiva infatti alcuna modificazione in seguito al trattamento.

L'analisi *Western blotting* condotta sui terreni di coltura (Figura 18, B) dimostrava che le proteine erano secrete in forme di complessi, tutti ad un peso molecolare attorno a 150 kDa, mentre non si rilevavano le forme a pesi molecolari intermedi e inferiori presenti invece nei lisati cellulari.

Il riscontro che dopo 20 h di incubazione l'espressione di HSP-90, HSP70 ed MMP-9 nei terreni era inferiore a quella misurata dopo 3.0 h e soprattutto a 5.0 h, poteva essere spiegato considerando che la secrezione proteica andava aumentando nelle prime ore per poi ridursi o cessare, così che le stesse proteine risultavano meno concentrate (o relativamente più diluite) alla fine di 20 h di incubazione. Non si può neanche escludere comunque che parte delle proteine subisca una degradazione proteolitica e che quindi una volta ridotta o cessata la secrezione attiva, il fenomeno di degradazione porti di conseguenza ad una minor evidenza delle proteine nel mezzo di coltura.

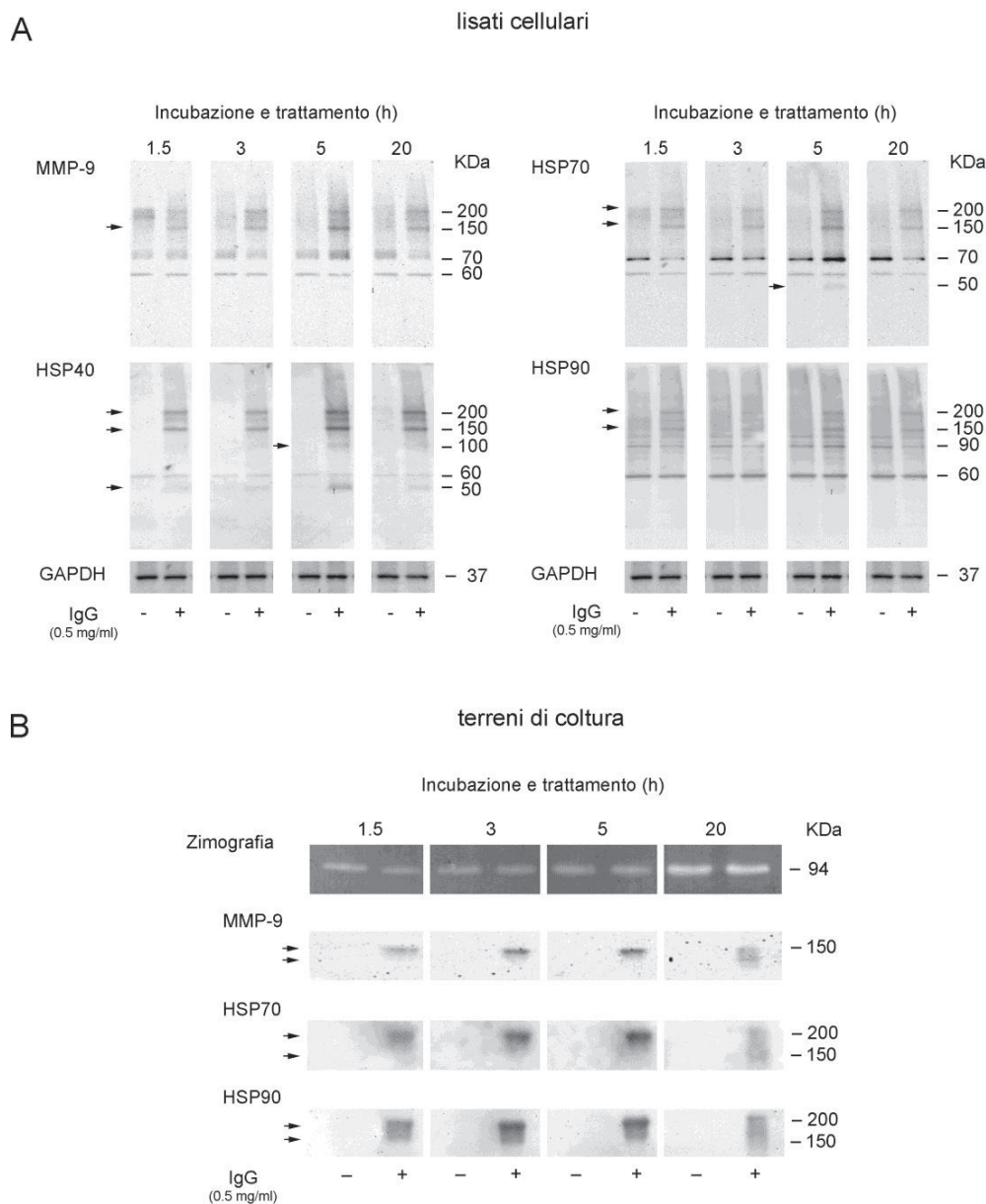


Figura 18. Espressione proteica nei lisati cellulari e nei terreni di coltura dopo trattamento continuo con IgG. (A) *Western Blotting* per le proteine indicate sui lisati totali delle cellule trattate con 0.5 mg/ml di IgG. L'analisi è stata condotta come indicato nei Metodi usando Ac monoclonali anti-MMP-9 e anti-HSP70 e policlonali anti-HSP40, anti-HSP90 e anti-GAPDH, per la normalizzazione del contenuto proteico. In ogni lane sono stati caricati 15 µg di proteine. Nella figura è riportato un *blotting* rappresentativo di altri due condotti in tempi diversi. (B) Analisi dei terreni di coltura corrispondenti ai tempi di incubazione delle cellule come in (A). Dopo l'incubazione, i terreni sono stati raccolti, dializzati, liofilizzati e risospesi in 500 µl di *sample buffer*. Sui terreni è stata misurata l'attività gelatinasica per MMP-9 mediante zimografia (vedi Metodi) e l'espressione di MMP-9, HSP70 e HSP90. Nel gel corsa della zimografia sono evidenziate le bande di digestione enzimatica (bande chiare su sfondo scuro) dell'isoforma di 94 kDa della MMP-9, corrispondente alla forma che viene attivata artificialmente dalla metodica. Sono riportati qui i risultati di un esperimento rappresentativo di altri due condotti in tempi diversi. In (A) e (B), a destra di ogni lane sono riportati i pesi molecolari di riferimento in kDa. Le frecce indicano le bande che si differenziano dal controllo per il trattamento.

La misurazione dell'attività proteolitica della MMP-9 nel terreno mediante zimografia dimostrava che vi era un incremento tempo-dipendente di questa attività enzimatica che però non era minimamente influenzata dalle IgG (Figura 18, B). Questo risultato, assieme al riscontro della significativa espressione di forme nuove di MMP-9 sia nei lisati che nei terreni, indicava che la MMP-9 implicata nel processo di modificazione strutturale delle HUVECs indotto dalle IgG non era la forma proteoliticamente attiva bensì una specie (o più specie) inattiva(e) di MMP-9, sulla cui formazione e ruolo nel processo angiogenetico esiste già ampia documentazione (Carmeliet P, 2000; Stetler-Stevenson WG, 1999; Tramentozzi E, 2011).

1.3 Vie di segnale coinvolte nell'induzione di forme nuove di HSPs e di MMP-9

I risultati degli esperimenti condotti sui lisati cellulari e sui terreni di coltura a diverse ore di incubazione suggerivano che il meccanismo molecolare attivato dalle IgG poteva coinvolgere delle vie di segnale nelle HUVECs riconosciute come più frequentemente implicate nei processi di differenziamento cellulare. Per valutare se in particolare la via delle MEK-ERK1/2 e/o la via PI3K/Akt mediassero gli effetti delle IgG, si sono misurate le espressioni di queste proteine nei lisati cellulari alle stesse ore di incubazione alle quali si erano osservati gli effetti sull'espressione proteica. È noto che un'intensa e prolungata attivazione delle ERK1/2 è responsabile del differenziamento delle HUVECs in formazioni simil-tubulari che caratterizzano il processo angiogenetico (Ebisuya M, 2005; Murphy LO, 2006), come è altrettanto noto che la via PI3K/Akt ha un ruolo cruciale nel processo di proliferazione e differenziamento delle cellule endoteliali (Somanath PR, 2006; Tramentozzi E, 2011). I risultati di queste specifiche indagini hanno rivelato che in presenza di IgG solo la forma totale e quella fosforilata di Akt risultavano stimolate, mentre nessuna delle forme di ERK1/2 sembrava essere coinvolta (Figura 19). In particolare, la stimolazione dell'Akt era visibile solo dopo 5.0 h di incubazione con le IgG, dato questo che coincideva con il tempo in cui comparivano anche le più intense modificazioni nell'espressione proteica, mentre non si misurava alcun effetto stimolante dopo 20 h di incubazione (Figura 18, A).

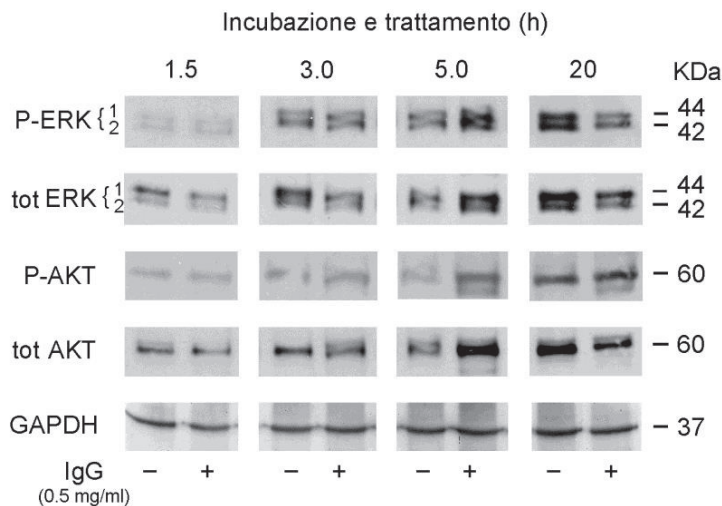


Figura 19. Espressione delle forme totali e fosforilate delle proteine ERK1/2 e AKT nei lisati cellulari. I lisati totali delle cellule, trattate con una concentrazione di 0.5 mg/ml di IgG, sono stati analizzati dopo 1.5, 3.0, 5.0 e 20 h d'incubazione per l'espressione di ERK1/2 e Akt totali e fosforilate con gli Ac policlonali anti-P-ERK1/2, anti-ERK totale e anti-P-AKT e monoclonali anti-AKT totale. La membrana è stata analizzata poi con Ac anti-GAPDH per la normalizzazione del carico proteico. In ogni lane sono stati caricati 15 µg di proteine. Nella figura è riportato un *blotting* rappresentativo di altri due condotti in tempi diversi.

Il dato era compatibile con un meccanismo di attivazione selettivo, piuttosto lento nella sua comparsa e apparentemente di durata relativamente breve. In accordo con quanto riportato in letteratura, la stimolazione di questa via metabolica precedeva temporalmente l'effetto di trasformazione fenotipica delle cellule che risultava massimo ad un tempo di incubazione (20 h) al quale la stimolazione della via IP3/Akt era già comparsa.

1.4 Effetti delle IgG sulle HUVECs dopo trattamento di durata più breve dell'incubazione

1.4.1 Effetti morfologici

I risultati degli esperimenti condotti sulle cellule a vari tempi di incubazione con le IgG avevano dimostrato che mentre l'effetto di trasformazione morfologica aveva il suo picco dopo 20 h di incubazione, le maggiori modificazioni dell'espressione delle proteine coinvolte nel processo di ri-arrangiamento strutturale si registravano attorno

alle 5.0 h. Questo faceva pensare che le trasformazioni fenotipiche potessero essere sfasate temporalmente rispetto alle modificazioni riguardanti la sintesi proteica, che quindi dovevano precedere ed essere causalmente collegate con le successive alterazioni morfologiche. Da questa indicazione hanno preso spunto gli esperimenti successivi in cui l'incubazione delle IgG è stata condotta a tempi brevi, inizialmente di 3.0 h e 5.0 h, seguiti dalla eliminazione del terreno contenente le IgG aggiunte inizialmente e successiva incubazione con terreno fresco fino alle 20 h. A questo “*end-point*” le cellule sono state esaminate al microscopio ottico, lisate ed analizzate per l'espressione delle proteine d'interesse, analogamente a quanto era stato fatto nei precedenti esperimenti in cui le IgG erano state lasciate in coltura con le cellule fino alla fine di ogni singolo tempo di incubazione.

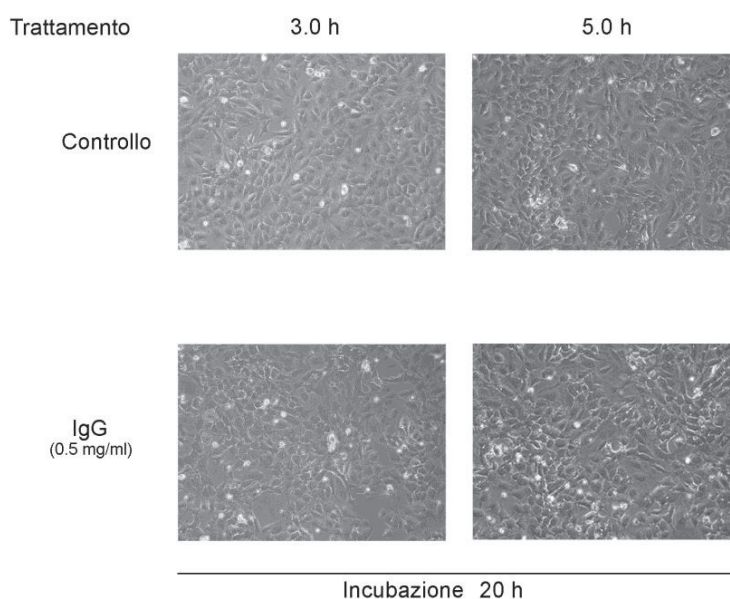


Figura 20. Modificazioni morfologiche delle HUVECs dopo trattamento con IgG per 3.0 e 5.0 h. Le cellule sono state coltivate in doppio come indicato nei Metodi e, dopo la quiescenza, sono state incubate in assenza (controllo) e presenza di 0.5 mg/ml di IgG per 3.0 e 5.0 h. Il terreno è stato poi cambiato e l'incubazione protratta fino alle 20 h, tempo al quale le cellule sono state esaminate al microscopio ottico. I quadri morfologici sono rappresentativi di molti altri osservati nello stesso esperimento e in altri due esperimenti condotti in tempi diversi. Ingrandimento di 10x.

Risultati

A differenza di quanto si era visto con il trattamento continuo ai tempi di incubazione di 3.0 e 5.0 h, l'esame delle cellule dopo trattamento con IgG per 3.0 o 5.0 h, seguito da cambio terreno e successiva incubazione fino a 20 h, non ha rivelato alcuna modificazione morfologica (Figura 20).

Il risultato provava che le IgG dovevano rimanere in contatto con le cellule per un tempo sufficientemente lungo perché si potessero manifestare le modificazioni morfologiche, altrimenti l'allontanamento delle IgG dal mezzo di coltura permetteva alle cellule di recuperare la condizione basale.

1.4.2 Effetti sull'espressione cellulare e secrezione di proteine di rilievo

La conferma che lo stimolo indotto dalle IgG poteva essere reversibile veniva dalle misure dell'espressione delle proteine condotte sui lisati cellulari e nel terreno di coltura nelle stesse condizioni di cui sopra, che dimostravano l'assenza di ogni modificazione nella sintesi delle proteine analizzate come pure la completa assenza di secrezione (Figura 21)

Questo risultato confermava anche che le modificazioni dell'espressione delle proteine cellulari osservate dopo trattamento continuo con le IgG (Figura 18) erano da mettersi in relazione causale con le modificazioni morfologiche evidenziate successivamente. Come era prevedibile, anche la misurazione dell'espressione delle ERK1/2 e dell'Akt, sia totali che fosforilate dopo il trattamento con IgG per un periodo più breve del tempo di incubazione, non mostravano alcuna variazione (dati non riportati). Apparentemente, quindi, i risultati ottenuti dimostravano la necessità che le IgG rimanessero a contatto con le cellule continuamente e per un periodo determinato per ottenere l'attivazione dei meccanismi risultanti nelle conclamate alterazioni morfologiche.

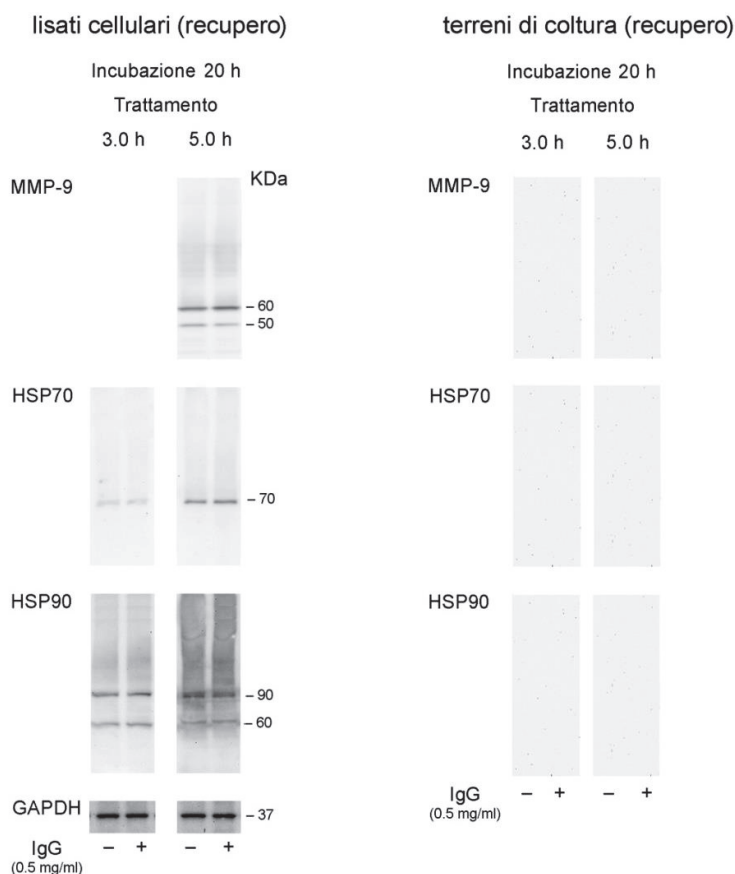


Figura 21. Espressione proteica di *heat shock proteins* ed MMP-9 dopo trattamento con IgG per 3.0 e 5.0 h. Le cellule sono state trattate come riportato nella didascalia della Figura 4. Alla fine dell'incubazione di 20 h i lisati e i terreni di coltura sono stati analizzati per l'espressione di MMP-9, HSP70 e HSP90, come specificato nei Metodi. La rivelazione con GAPDH è servita per la normalizzazione del contenuto proteico in ogni lane. Per ogni lane sono stati caricati 15 μ g di proteine. I terreni di coltura, finita l'incubazione, sono stati raccolti, dializzati, liofilizzati e risospesi in 500 μ l di *sample buffer*, ed analizzati. Le analisi con Western blotting non hanno mostrato alcuna positività per le proteine testate. A destra dei lanes sono riportati i pesi molecolari di riferimento in kDa.

1.5 Effetti delle IgG sull'espressione e secrezione di nuove IgG

1.5.1 Effetti per il trattamento continuo e parziale con IgG. Analisi con *Western blotting*

E' noto dalla letteratura più recente che le IgG possono essere prodotte non solo dai linfociti B ma anche da cellule non linfoidi, per esempio i neuroni del SNC, le cellule epiteliali della ghiandola mammaria e più recentemente ancora è stato dimostrata la produzione di IgG nelle HUVECs (Zhao Y, 2011). Considerando che l'obiettivo di questa tesi era quello di verificare se le cellule endoteliali potessero essere un target per

Risultati

la manifestazione degli effetti terapeutici delle IgG somministrate in varie patologie, era importante stabilire se le IgG erano in grado o meno di indurre nelle HUVECs l'espressione di nuove IgG, analogamente a quello che si era visto per l'espressione di altre proteine. Per questo scopo si sono allestiti degli esperimenti in cui le HUVECs sono state incubate con le IgG sia per un tempo uguale al tempo di incubazione totale (trattamento così detto continuo) come pure per un tempo più breve del tempo di incubazione finale (trattamento parziale con recupero). Nel primo caso, il trattamento è stato fatto a 3.0, 5.0 e 20 h e l'analisi dei lisati cellulari a questi tempi di trattamento continuo hanno dimostrato che mentre nei controlli vi era uno scarso o nullo segnale di espressione delle IgG, nei trattati, specialmente dopo 20 h di incubazione, la positività per le IgG era notevole (Figura 22, A, pannello a sinistra). Dato che l'analisi di *Western blotting* era condotta in condizioni non riducenti dei campioni, il rilievo di bande positive per IgG anche al peso molecolare di 50 kDa suggeriva la presenza nella cellula di subunità di IgG non ancora assemblate nella forma intera di 150 kDa. La possibilità che queste subunità fossero Fab è stata confermata in *Western blotting* con anticorpi specifici contro i Fab con i quali l'espressione di queste bande risultava particolarmente intensa (dato non mostrato).

Negli esperimenti in cui le IgG sono state aggiunte alle HUVECs con trattamento parziale di 5 h, seguito poi da incubazione con terreno fresco senza IgG fino alle 20 h, si è notato che anche in questo caso, seppur con intensità minore rispetto a quanto osservato con il trattamento continuo, vi era una stimolazione dell'espressione di IgG (Figura 22, A, pannello a destra). Quindi, a differenza di quanto si era visto per l'espressione delle HSPs e per MMP-9, la rimozione delle IgG dal terreno non aboliva la stimolazione dell'espressione delle IgG.

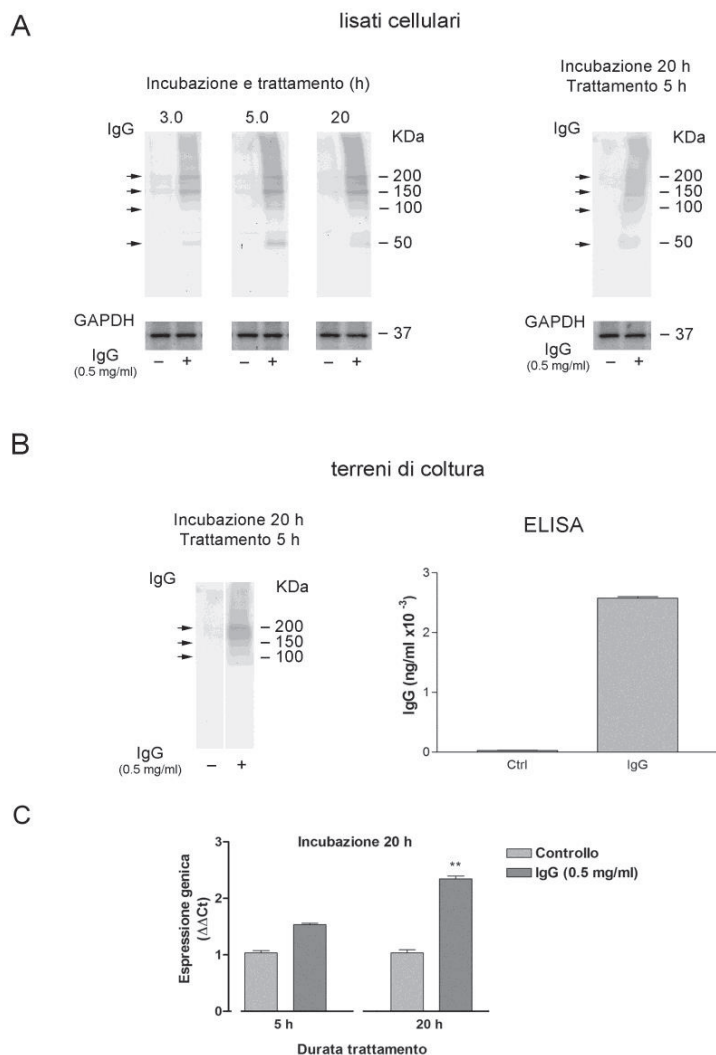


Figura 22. Espressione *ex-novo* delle IgG indotta dal trattamento con IgG. (A) Le cellule sono state coltivate come riportato nelle didascalie alle figure 17 B e 20 e trattate con IgG, per un tempo uguale a quello dell'incubazione (3.0, 5.0 e 20 h) (pannelli a sinistra), come pure sottoposte a trattamento per 5 h seguito da incubazione fino alle 20 h (pannello a destra). I lisati sono stati analizzati per l'espressione di IgG. Per la normalizzazione del contenuto proteico la membrana è stata analizzata per GAPDH. Per ogni lane sono stati caricati 15 μ g di proteine. A destra dei lanes sono riportati i pesi molecolari di riferimento in kDa. Le frecce indicano le bande che si differenziano dal controllo per il trattamento. (B) Dopo incubazione i terreni di coltura sono stati raccolti, dializzati, liofilizzati e risospesi in 500 μ l di *sample buffer*, ed analizzati per l'espressione di IgG (pannello a sinistra). Nel pannello a destra: misurazione della concentrazione di IgG nei terreni con metodo ELISA (vedi Metodi). Il valore medio (\pm DS) della concentrazione di IgG nel controllo è di 25.3 ± 8.8 ng/ml, e nel trattato di 2578.7 ± 31.6 ng/ml. (C) Espressione genica delle IgG misurata con metodo RT-PCR. Le cellule sono state trattate con IgG per 5 o 20 h e l'incubazione protratta fino a 20 h, alla fine della quale le cellule sono state lisate in tampone, si è estratto l'RNA totale e proceduto alla sua retro-trascrizione a cDNA, seguendo la procedura descritta nei Metodi. L'altezza di ogni istogramma rappresenta i valori medi (\pm DS) di espressione genica calcolati secondo il metodo comparativo del ciclo soglia ($\Delta\Delta$ Ct). Dopo 5 h di trattamento i valori medi (\pm DS) di espressione genica sono di 1.55 ± 0.04 contro un controllo di 1.04 ± 0.05 (media di tre esperimenti condotti in doppio in tempi diversi). Dopo 20 h di trattamento i valori sono di 2.35 ± 0.07 contro il rispettivo controllo 1.04 ± 0.07 . ** $p < 0.01$ (Student's t-test).

1.5.2 Espressione *ex-novo* e secrezione di IgG nel mezzo di coltura

Dato che la stimolazione dell'espressione di IgG nei lisati cellulari suggeriva anche la possibilità che le IgG di nuova sintesi potessero essere secrete, si è proceduto alla misurazione delle IgG nei terreni dopo 20 h di incubazione nelle condizioni di trattamento parziale. L'analisi con *Western blotting* indicava la presenza di IgG esclusivamente nella forma di molecola intera, rivelata dalla positività confinata ai pesi molecolari di 150-200 kDa (Figura 22, B). Quindi, a differenza di quanto visto nella cellula, solo le forme assemblate di IgG erano secrete nel mezzo di coltura, come avviene di norma anche nelle cellule immuni competenti. Dato che l'analisi di *Western blotting* è solo qualitativa e non permette di valutare la reale concentrazione delle IgG secrete, queste sono state misurate anche con metodo ELISA. Si è visto così che in due esperimenti separati la concentrazione media di IgG nei terreni di controllo dopo 20 h di incubazione (con cambio di terreno alle 5.0 h) era di 25.3 ± 8.7 ng/ml, mentre dopo trattamento di 5.0 h ed incubazione a 20 h raggiungeva il valore di 2.580 ± 31.6 ng/ml (Figura 22, B), valore che dimostrava come anche uno stimolo relativamente breve da parte delle IgG potesse essere sufficiente a produrre una notevole sintesi e secrezione di nuove IgG. L'analisi genica mediante *real-time* PCR confermava che la sintesi *ex-novo* di IgG indotta dalle IgG aggiunte al terreno era dovuta ad un aumento dell'espressione genica (Figura 22, C): l'aumento era evidente già dopo trattamento parziale di 5.0 h (anche se statisticamente non significativo), mentre più consistente ed altamente significativo era l'incremento di espressione genica per il trattamento prolungato per tutto il tempo di incubazione di 20 h.

1.6 Coinvolgimento del recettore FcRn nella sintesi “*ex-novo*” e nella secrezione di IgG

E' noto dalla letteratura il ruolo svolto dal recettore FcRn nel mantenimento dell'omeostasi delle IgG, grazie al fatto di mediare la transitosi bidirezionale delle IgG nelle cellule polarizzate (Dickinson BL, 1999; Rojas R, 2002). E' stato dimostrato anche che le cellule endoteliali nelle quali è indotta l'espressione del recettore FcRn sono in grado di internalizzare più IgG di quanto non facciano le cellule che non esprimono il recettore in elevata concentrazione, risultato questo che potrebbe essere

messo in relazione con la funzione di regolazione omeostatica svolta dall'endotelio sulle IgG circolanti (Goebel NA, 2008). Risultava quindi interessante vedere se l'espressione *ex-novo* di IgG nelle HUVECs poteva essere accompagnata da analoga espressione del recettore FcRn.

Nelle HUVECs di controllo il recettore era scarsamente o per nulla evidenziato nell'analisi *Western blotting* con l'Ac specifico monoclonale, mentre c'era una marcata positività con il trattamento continuo con IgG specialmente dopo 20 h (Figura 23, A).

Anche se meno evidente, era comunque visibile una certa positività per il recettore con il trattamento di 5.0 h seguito da incubazione fino alle 20 h (Figura 7, A, pannello a destra). Di nota era il fatto che la positività per FcRn nei lisati cellulari si localizzava sempre a pesi molecolari elevati, superiori al peso molecolare atteso del monomero corrispondente a circa 50-60 kDa (Rojas R, 2002) e solo dopo 20 h di trattamento si notava la comparsa di una banda a circa 50 kDa riferibile al monomero (Figura 23, A, pannello a sinistra). Mentre la banda di FcRn a 200 kDa poteva essere spiegata dall'associazione del recettore con le IgG intere, le bande a 150 e 100 kDa più probabilmente corrispondevano alla formazione di dimeri e trimeri di FcRn, come è stato riportato in letteratura (Zhu X, 2002; Raghavan M, 1995). Interessante era il dato che dimostrava come analoga positività per FcRn a pesi molecolari di 150-200 kDa si trovasse anche nei terreni di coltura dopo trattamento continuo per 5.0 h e, soprattutto, per 20 h (Figura 7, B, pannelli a sinistra). Il trattamento riducente dei campioni portava alla eliminazione delle bande a 200 kDa e alla comparsa di una debole banda a 50 kDa, probabile espressione del recettore singolo che si staccava dal complesso più grosso in associazione con le IgG. Rimaneva invece intatta la positività a 100 kDa, a dimostrazione del fatto che il trattamento riducente non era stato sufficiente ad eliminare il legame nel dimero (Raghavan M, 1995).

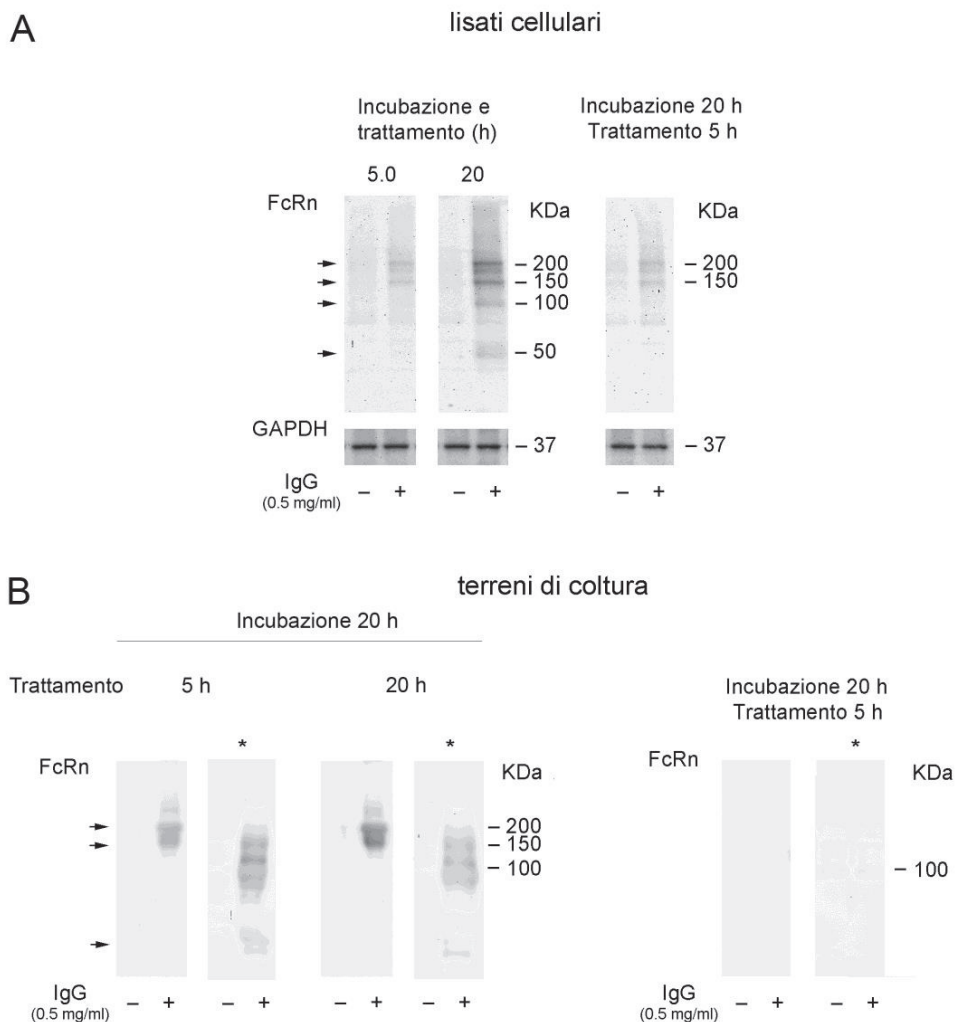


Figura 23. Espressione del recettore FcRn nei lisati cellulari e nei terreni di coltura delle HUVECs. (A) Le cellule sono state coltivate come riportato nelle Figure 17 B e 20 e trattate con IgG per tutto il tempo di incubazione di 5 e 20 h (pannelli a sinistra), come pure sottoposte a trattamento per 5 h seguito da incubazione fino alle 20 h (pannello a destra). Dopo l'incubazione, le cellule sono state lisate e sui lisati misurata l'espressione di FcRn con Ac monoclonali. In ogni lane sono stati caricati 15 μ g di proteine. (B) Dopo incubazione i terreni di coltura sono stati raccolti, dializzati, liofilizzati e risospesi in 500 μ l di *sample buffer*, dopo di che si è proceduto alla misurazione dell'espressione proteica di FcRn. *, campioni sottoposti a trattamento riducente con β -mercaptoetanolo. In (A) e (B), a destra dei lanes sono riportati i pesi molecolari di riferimento in kDa. Le frecce indicano le bande che si differenziano dal controllo per il trattamento.

Anche se più debole, la positività per il recettore nei terreni era presente anche dopo trattamento parziale di 5.0 h seguito da incubazione fino a 20 h (Figura 23, B, pannelli a destra).

I risultati complessivamente dimostravano che il recettore FcRn era coinvolto attivamente non solo nel processo di endocitosi ma anche nel processo di secrezione delle IgG di nuova sintesi.

I dati relativi agli esperimenti di *Western blotting* per le IgG sui lisati cellulari non permettevano di stabilire la localizzazione delle IgG nelle cellule e quindi di capire se gli effetti prodotti dalle IgG sulla loro stessa espressione cellulare erano mediati dal recettore sulla membrana o seguivano l'internalizzazione del complesso recettore-IgG nelle cellule. Considerando che l'espressione maggiore di sintesi "ex-novo" di IgG come pure di secrezione si riscontrava dopo trattamento prolungato (20 h) delle HUVECs con IgG (Figura 23), si è quindi proceduto a fare degli esperimenti di immunofluorescenza sulle cellule dopo trattamento ed incubazione a 20 h. I risultati hanno mostrato che, a differenza del controllo in cui non c'era alcuna evidenza della presenza di IgG (Figura 24, A), nei trattati compariva una marcata fluorescenza delle IgG focalizzata in vescicole intra-cellulari disposte attorno al nucleo ma anche presente come fini punteggiature nei prolungamenti citoplasmatici (Figura 24, B e C).

L'analisi in sezioni multiple delle cellule al microscopio confocale ha permesso di assegnare alle vescicole una localizzazione citoplasmatica separata dal nucleo come pure dalla membrana cellulare con la quale non vi era apparentemente fusione (Figura 24, D).

A conferma di quanto rilevato anche nel *Western blotting*, l'analisi di immunofluorescenza dimostrava il notevole incremento dell'espressione di actina nelle cellule trattate con IgG rispetto al controllo (Figura 24, pannelli a destra). Anche se i dati dell'immunofluorescenza non permettevano di discriminare se il traffico intra-cellulare delle IgG era prevalentemente in entrata o in uscita, il risultato della esclusiva localizzazione vescicolare endocellulare delle IgG indicava che il meccanismo di stimolazione della sintesi proteica come pure la secrezione di proteine indotta dalle IgG nelle HUVECs non dipendeva dall'attivazione del recettore ad esclusiva localizzazione di membrana ma implicava la sua internalizzazione.

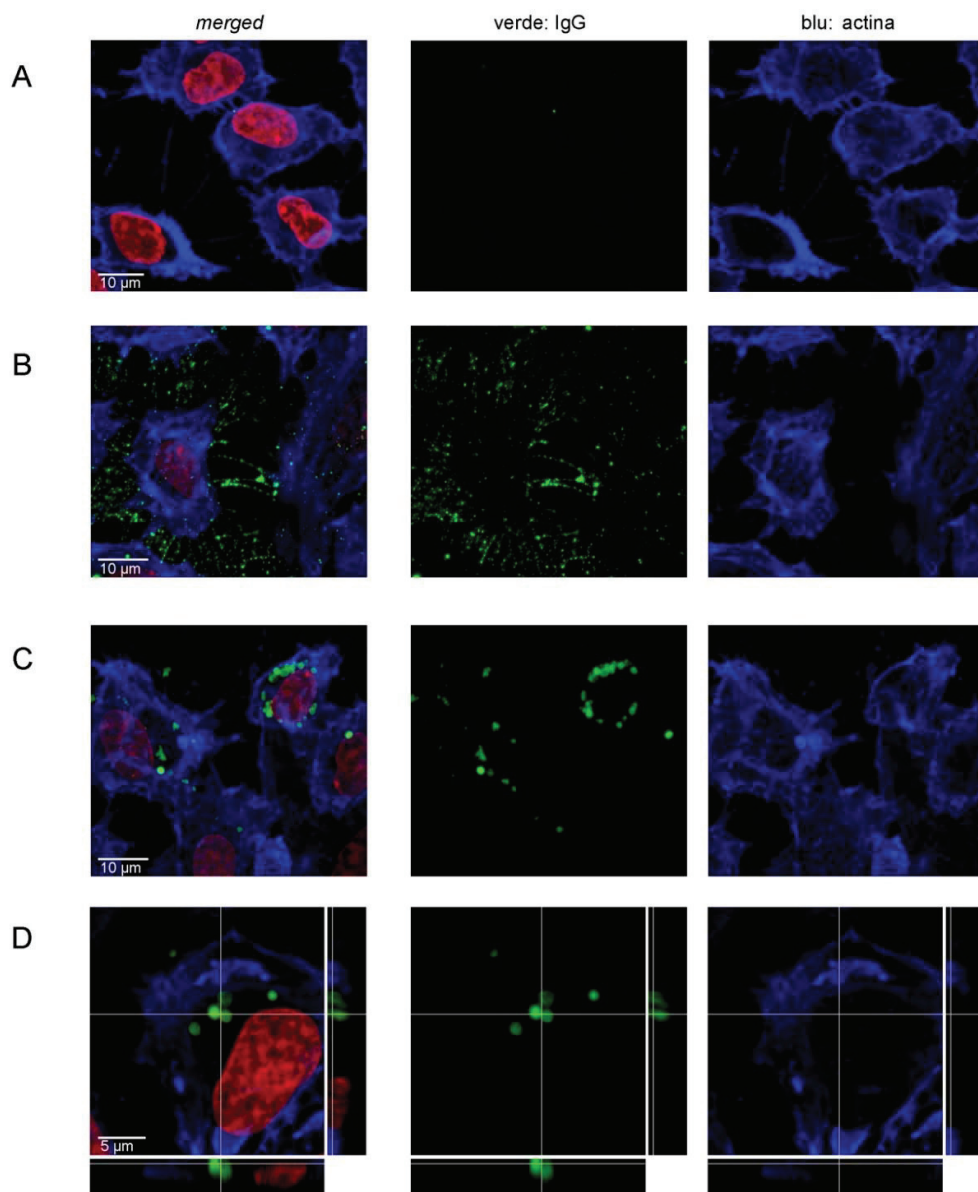


Figura 24. Analisi delle IgG nelle HUVECs mediante microscopia confocale. Le cellule sono state incubate senza (A, controllo) e con IgG 0.5 mg/ml (B, C, D) per 20 h. Le cellule sono state poi fissate con metanolo, permeabilizzate con saponina, incubate con la soluzione bloccante di BSA e poi con gli Ac. In figura sono riportate immagini rappresentative di numerosi altri quadri acquisiti al microscopio confocale in tre esperimenti separati, delle cellule marcate con anticorpi anti-IgG (segnale verde), anti-actina (segnale blu) e con ioduro di propidio (segnale rosso, per l'evidenziazione del nucleo), come specificato nei Metodi. Nei pannelli, da destra: fluorescenza dovuta alla sola actina, alle sole IgG e fluorescenza sovrapposta delle tre condizioni (*merged*). Pannello D: immagini di cellule trattate con l'indicazione (linee grigie) della posizione di acquisizione dell'immagine sui piani ortogonali XZ (sezioni orizzontali) e YZ (sezioni verticali). Si può rilevare come alla stessa profondità le vescicole positive per le IgG siano separate dal nucleo e dall'actina. In ogni pannello sono indicate le barre di calibrazione.

Da rilevare il fatto che in ripetuti esperimenti di immunofluorescenza non si è mai riusciti a dimostrare la presenza del recettore FcRn sia nei controlli che, soprattutto, nei trattati (dato non mostrato). In questo caso, il risultato negativo può essere spiegato dall'incapacità dell'anticorpo specifico utilizzato nell'immunofluorescenza, di rilevare nella cellula intera il recettore che rimane sempre stabilmente legato alle IgG come dimostrato anche negli esperimenti di *Western blotting*. Le IgG possono così aver mascherato il sito antigenico del recettore impedendo all'anticorpo di legarsi ed evidenziare la presenza del recettore.

2. EFFETTI DELLE IgG SUI PBMCs

2.1 Modificazioni morfologiche

In una serie differente di esperimenti, le IgG sono state incubate con i PBMCs isolati dal sangue di volontari sani, con lo scopo di verificare se gli effetti riscontrati sulle HUVECs erano riprodotti anche nelle cellule fisiologicamente deputate alla produzione di Ig. A questo specifico scopo, sono stati esaminati tre soggetti sani la cui percentuale di cellule B (CD19⁺) nella popolazione mista di PBMCs, sia al momento del prelievo (tempo zero), come pure dopo incubazione di 12 giorni, è riportata in Tabella 3.

	Tempo di incubazione (giorni)	T ₀	CD19 ⁺ (%)			
			T ₁₂			
			IgG (mg/ml)	0	0.2	0.5
Soggetto	#1	4.0	4.5	4.7	5.5	5.7
	#2	1.1	7.1		7.7	
	#3	10.1	2.6		2.3	

Tabella 3. Valori (in percentuale) di cellule B (CD19⁺) nei tre soggetti sani, misurate al tempo zero (T₀) corrispondente al momento del prelievo che dopo incubazione di 12 giorni (T₁₂).

A parte la variabilità nei valori percentuali dei linfociti B al tempo zero, spiegata dalla diversa condizione basale del sistema immunitario nei singoli soggetti, si è visto che il

Risultati

numero di queste cellule dopo incubazione ed in presenza di IgG cambiava apparentemente in modo inverso rispetto al valore di base, subendo un aumento laddove il valore di base era basso ed una diminuzione per un valore basale elevato (Tabella 3). Analogamente agli esperimenti condotti sulle HUVECs, anche sui PBMCs sono state saggiate prima concentrazioni scalari di IgG in incubazione per complessivi 12 giorni, alla fine dei quali sono state esaminate le cellule al microscopio ottico. Nella Figura 25 sono riportate le immagini, a due diversi ingrandimenti, dei PBMCs del soggetto #1, come rappresentativo degli altri due, in presenza di concentrazioni scalari di IgG.

I quadri sono indicativi di una stimolazione, in funzione della concentrazione delle IgG, nella formazione di grossi agglomerati di linfociti e monociti che dominano ogni campo di osservazione. Considerando che le modificazioni morfologiche erano particolarmente significative già con 0.5 mg/ml di IgG, si è scelta questa concentrazione nei successivi esperimenti di incubazione, analogamente a quanto fatto con le HUVECs. Come nel soggetto # 1, così anche nel soggetto #2 dopo 12 giorni di incubazione si sono notati fenomeni di stimolazione nella proliferazione con la comparsa di aggregati non presenti nel controllo (Figura 2).

Le modificazioni morfologiche osservate in presenza di IgG erano compatibili con un processo di differenziamento cellulare in linfociti di forma e dimensioni normali che, a differenza che nel controllo, costituivano un tappeto omogeneo e regolare intervallato dalla presenza di grossi agglomerati.

Nel soggetto #2, come anche nel soggetto #3, i PBMCs sono stati sottoposti a trattamento con le IgG e ad incubazione per tempi diversi; in particolare, è stato fatto il trattamento continuo per la durata dell'incubazione di 5 giorni, come pure un trattamento per 2 giorni seguito da cambio di terreno e successiva incubazione fino a 5 o a 12 giorni.

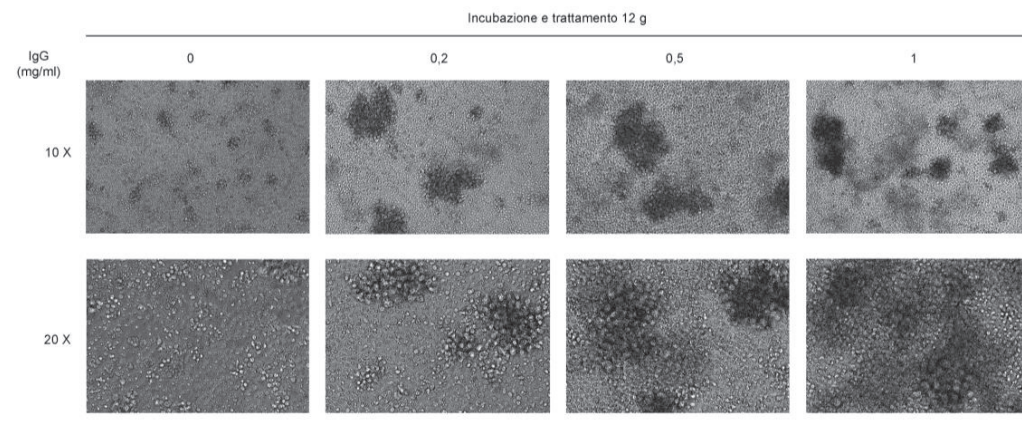


Figura 25. Modificazioni morfologiche indotte dalle IgG sui PBMCs. I PBMCs sono stati coltivati come descritto nei Metodi seminando 2.000.0000 cellule per pozzetto (in doppio) in assenza (controllo) e presenza di concentrazioni scalari di IgG. Dopo incubazione di 12 giorni le cellule sono state esaminate al microscopio ottico. Nella figura sono riportati i quadri morfologici rappresentativi di molti altri osservati nello stesso esperimento, relativi al soggetto #1. Ingrandimento di 10x e 20x.

Nella condizione in cui il trattamento è stato fatto a tempi più brevi dell'incubazione, lo scopo era quello di vedere se, analogamente a quanto rilevato nelle HUVECs, anche nei PBMCs lo stimolo innescato dalle IgG potesse proseguire indipendentemente dalla presenza delle IgG nel mezzo. Nel caso del trattamento per 2 giorni seguito da incubazione fino a 12 giorni, si è visto che le modificazioni indotte da IgG non erano così rilevanti rispetto a quelle notate con il trattamento continuo per 12 giorni, anche se erano comunque caratterizzate dalla presenza di agglomerati (Figura 26, quadri a destra). Situazione intermedia, fra il tempo di trattamento più breve e quello più lungo, si verificava per quanto riguarda sia la proliferazione che le modificazioni morfologiche nel senso della comparsa di linfociti normali, con il trattamento ed incubazione per 5 giorni (Figura 26).

Risultati

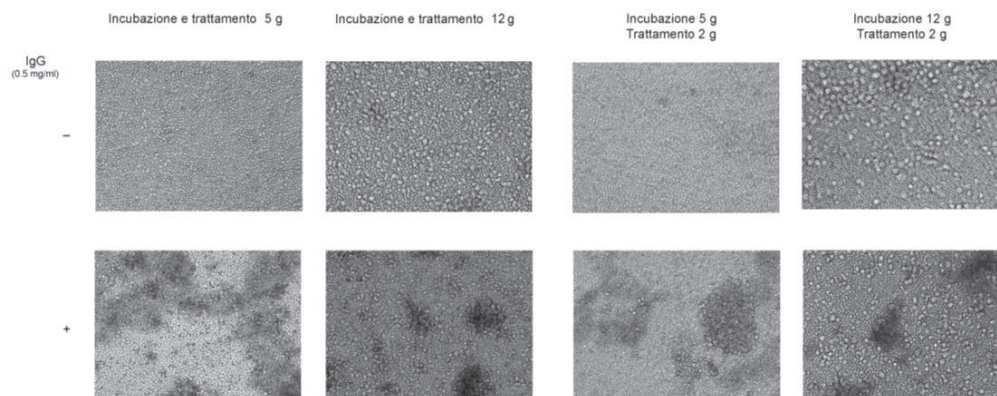


Figura 26. Modificazioni morfologiche dei PBMCs dopo trattamento con IgG per tempi diversi. I PBMCs sono stati coltivati, in assenza (controllo) e presenza di IgG (0.5 mg/ml). Le cellule sono state trattate con IgG per un tempo uguale all'incubazione (5 e 12 giorni) (pannelli a sinistra) o più breve (2 giorni) dell'incubazione (5 e 12 giorni) (pannelli a destra). Dopo l'incubazione, le cellule sono state esaminate al microscopio ottico e le immagini riportate rappresentano i quadri morfologici significativi per ogni condizione esaminata, relativi al soggetto #2. Ingrandimento di 10x.

Nel soggetto #3, dopo incubazione di 12 giorni, i PBMC di controllo mostravano un quadro compatibile con attiva stimolazione linfocitaria, caratterizzato da grosse cellule riferibili a monociti e dalla presenza di agglomerati (dati non mostrati). Il trattamento con IgG, fatto sia continuativamente per l'intero periodo di incubazione come pure per 2 giorni seguiti da incubazione fino a 12 giorni, mostrava un progressivo sfaldamento e riduzione degli agglomerati e comparsa di linfociti normali che sostituivano progressivamente i monociti nei quadri di osservazione (dati non mostrati).

I risultati di questi diversi esperimenti indicavano che, al di là della variabilità inter-individuale nella risposta al trattamento, si potevano riconoscere alcuni aspetti comuni nelle modificazioni indotte dalle IgG sui PBMCs dei tre soggetti esaminati. Innanzitutto, le modificazioni morfologiche indotte dalle IgG sui PBMCs pur essendo dipendenti nella loro intensità dal tempo di trattamento, erano comunque evidenti anche dopo un trattamento breve. Poi, si poteva riconoscere anche un comune denominatore nelle modificazioni qualitative che riguardavano prevalentemente un aumento della proliferazione di linfociti normali che, laddove il controllo era caratterizzato da cellule di grosse dimensioni (monociti e macrofagi), andava a sostituire e normalizzare il quadro iniziale.

2.2 Effetti sull'espressione cellulare di HSPs, IgG e FcRn

Sui lisati cellulari dei PBMCs dei soggetti #1-3, trattati per 12 giorni, come pure dopo trattamento per 2 giorni seguito da incubazione fino a 12 giorni (nei soggetti #2 e #3), si è misurata l'espressione di HSP70, HSP90, MMP-9, come pure di IgG e del recettore FcRn (Figura 27). Per il trattamento continuo a 12 giorni, non si sono evidenziate differenze significative rispetto al controllo per quanto riguarda l'espressione delle HSPs, anche se erano evidenti notevoli differenze interindividuali dell'espressione di queste proteine nei controlli (Figura 27, A). Mentre non compariva nessuna positività per la MMP-9, l'espressione intracellulare delle IgG risultava solo parzialmente stimolata dalle IgG nei soggetti #1 e #2. A differenza di quanto osservato nei lisati delle HUVECs, nei PBMCs l'espressione del recettore FcRn non risultava stimolata dalle IgG ed inoltre il recettore compariva solo ai pesi molecolari di 50-60 kDa, compatibili con la sua forma monomerica e non in complessi. Tale risultato potrebbe essere compatibile con il fatto che fra le cellule ematopoietiche il recettore è presente nei macrofagi, monociti e cellule dendritiche ma non nei linfociti T e B (Qiao SW, 2008). L'assenza del recettore nei B può giustificare il riscontro della sua forma normale e non complessata con IgG come invece osservato nelle HUVECs. Quindi, la positività per FcRn poteva essere quasi esclusivamente attribuibile alla componente di macrofagi, monociti e cellule dendritiche presente nei PBMCs e questo poteva anche giustificare la maggior positività riscontrata nei PBMCs del soggetto #3 (Figura 12, A), caratterizzati da una maggior componente di cellule di questo tipo già nel controllo.

L'esame dei lisati cellulari dopo trattamento breve, di 2 giorni, evidenziava, rispetto al trattamento prolungato, alcune differenze solo nel soggetto #3 che riguardavano le HSPs, la cui espressione era leggermente aumentata (Figura 27, B).

Il dato poteva essere interpretato come un effetto dovuto al trattamento temporaneo che, se prolungato, portava invece alla scomparsa della stimolazione, probabilmente in seguito a fenomeni di ri-aggiustamento omeostatico intra-cellulare ed in una particolare popolazione di cellule nei PBMCs.

Risultati

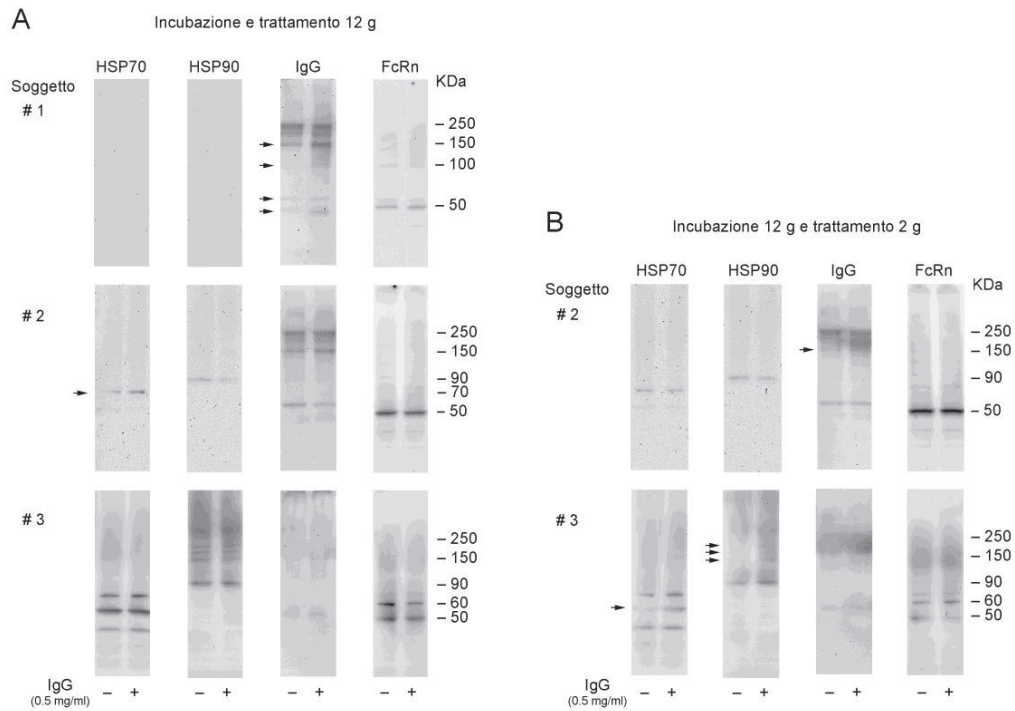


Figura 27. Espressione proteica di HSPs, IgG e FcRn nei lisati dei PBMCs. I PBMCs sono stati coltivati come descritto nella legenda alle Figura 25 e 26 in pozzetti in doppio, in assenza (controllo) e presenza di IgG (0.5 mg/ml) lasciate nel terreno per tutto il tempo dell'incubazione (12 giorni) (A) o per un tempo più breve (2 giorni) dell'incubazione (12 giorni) (B). Alla fine dell'incubazione, le cellule sono state lisate ed i lisati analizzati per HSP70, HSP90, IgG e FcRn. Per ogni lane sono stati caricati 15 µg di proteine. Per ogni soggetto, i blotting riportati si riferiscono ad un esperimento rappresentativo di altri due condotti in tempi diversi. A destra di ogni lane sono riportati i pesi molecolari di riferimento in kDa. Sia in (A) che in (B) le frecce indicano le bande che si differenziano dal controllo per il trattamento.

Se nei lisati cellulari complessivamente non si notava una eclatante differenza fra controlli e trattati, sia per trattamento lungo che breve, differente era invece la situazione nei corrispondenti terreni di coltura (Figura 28), dove, soprattutto per il trattamento di 12 giorni, si notava un'intensa positività per HSP70, HSP90 ed FcRn solo nei trattati ed a pesi molecolari analoghi a quelli trovati nei terreni delle HUVECs, compatibili con la presenza di omo- od etero-complessi della stessa massa (Figura 28, A). Solo per il recettore FcRn, ma non per le HSPs, si poteva notare la stimolazione della sua espressione nei terreni anche dopo trattamento breve (Figura 28, B).

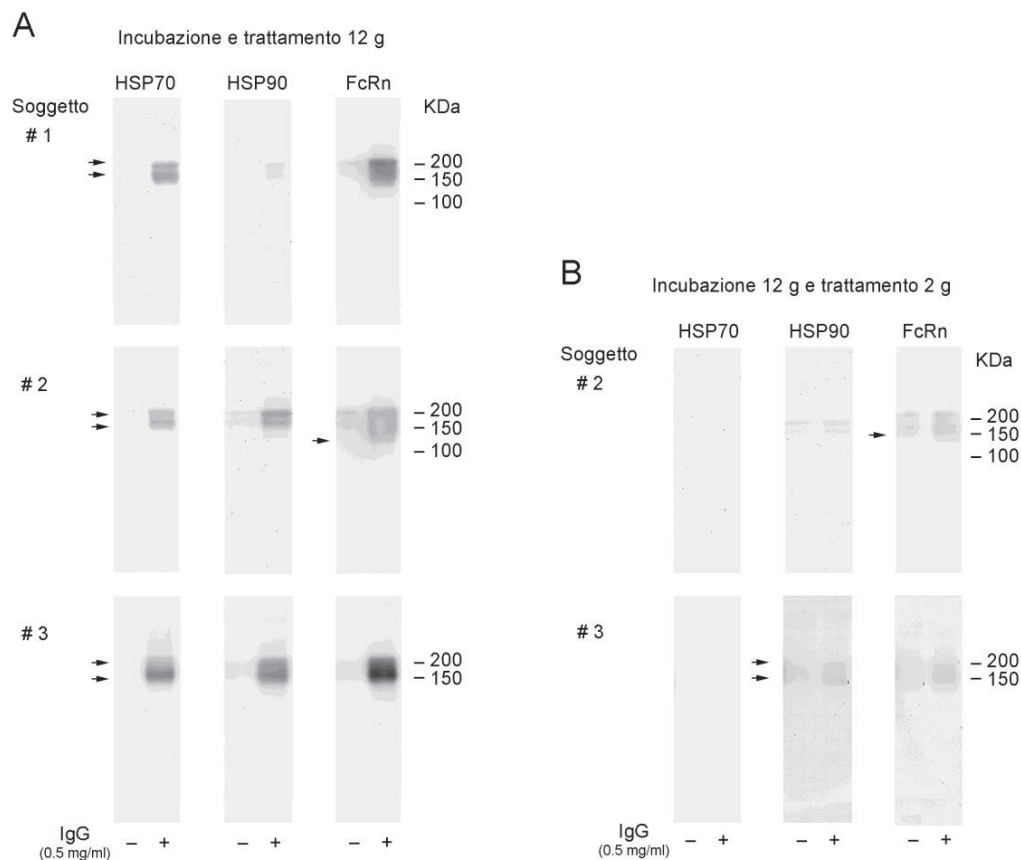


Figura 28. Espressione proteica di HSPs, IgG e FcRn nei terreni di coltura dei PBMCs. I PBMCs sono stati coltivati in assenza e presenza di IgG come descritto nelle didascalie delle Figura 25 e 26. Alla fine dell'incubazione di 12 giorni i terreni di coltura sono stati centrifugati per rimuovere i detriti cellulari e analizzati per HSP70, HSP90 e FcRn. **(A)** Analisi dell'espressione proteica nei terreni di coltura dei PBMC dei 3 soggetti dopo trattamento continuo di 12 giorni e **(B)** dopo trattamento di 2 giorni seguito da incubazione fino a 12 giorni. Per ogni lane sono stati caricati 8 μ l di terreno con 5 μ l di sample buffer. Gli altri dati sono come in Figura 27.

Questo risultato, a parte confermare quanto visto sulle HUVECs in cui l'espressione e secrezione delle HSPs dipendeva da uno stimolo applicato continuamente, suggeriva che il recettore poteva essere secreto dai PBMCs in forma di complessi anche dopo la rimozione dello stimolo delle IgG dal terreno. Alternativamente, la secrezione del recettore, probabilmente in associazione con le IgG, potrebbe avvenire solo durante il contatto delle cellule con le IgG ma essere così intensa da potersi rilevare anche dopo rimozione dello stimolo.

2.3 Effetti sulla secrezione di IgG nel mezzo di coltura

Tenuto conto del risultato riportato sopra, che indicava come il recettore FcRn fosse secreto dai PBMC sotto stimolo delle IgG e considerando il ruolo specifico svolto dal recettore nella secrezione delle IgG, si è voluto vedere se, analogamente a quanto evidenziato nelle HUVECs, le IgG potessero indurre la loro stessa espressione anche nei linfociti B, specificamente preposti a questa funzione. A questo scopo, si è proceduto alla misurazione della concentrazione di IgG nei terreni di coltura dei PBMCs dei soggetti #2 e #3 dopo trattamento delle cellule con IgG (0.5 mg/ml) per 2 giorni seguito da incubazione fino ai 12 giorni (Figura 28). Questa procedura permetteva di misurare le IgG che erano effettivamente sintetizzate “*ex-novo*” e secrete sotto stimolazione indotta dalle IgG. La misurazione effettuata mediante metodo ELISA ha evidenziato un incremento altamente significativo nella concentrazione di IgG secrete in entrambi i soggetti, anche se la stimolazione risultava di gran lunga più elevata nel soggetto #2 rispetto al #3 (Figura 29). Più precisamente, nel soggetto #2, la concentrazione delle IgG secrete sotto stimolazione era di 31.483,7 ($\pm 2.712,6$) ng/ml/ 10^4 cellule B (media \pm DS di 2 esperimenti condotti in doppio) rispetto al valore di controllo di 926,0 ($\pm 243,85$) ng/ml. Nel soggetto #3 invece la concentrazione di IgG dopo trattamento era di 2.893,1 ($\pm 220,17$) ng/ml rispetto al valore di 94,98 ($\pm 20,03$) ng/ml del controllo. La differente entità di stimolazione prodotta dalle IgG nei due soggetti può essere spiegata considerando che già in condizioni basali (nel controllo) la secrezione di IgG risultava più elevata (>100%) nel soggetto #2 rispetto al soggetto #3. In quest’ultimo, infatti, la percentuale dei linfociti B nel controllo dopo 12 giorni di incubazione era circa un terzo rispetto a quella del soggetto #2 (Tabella 3) il che poteva giustificare una risposta più pronta ed intensa dopo stimolazione con IgG da parte del soggetto #2.

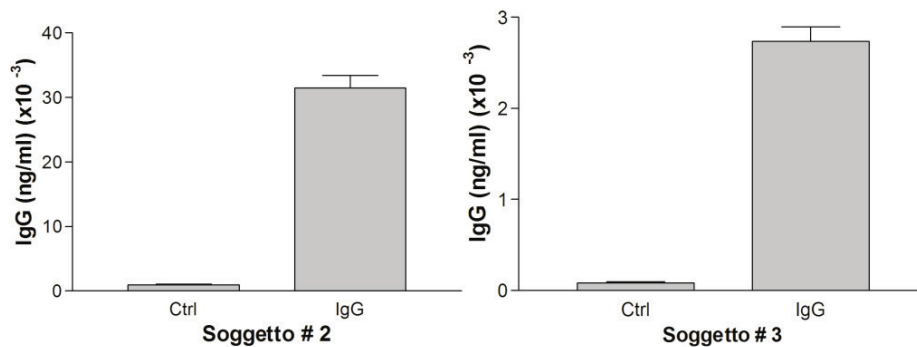


Figura 29. Misurazione della concentrazione di IgG nei terreni di coltura dei PBMCs.

Le IgG sono state misurate nei terreni di coltura dei PBMCs dei soggetti #2 e #3 dopo che le cellule erano state trattate con IgG (0.5 mg/ml) per 2 giorni e l'incubazione proseguita fino a 12 giorni. La misurazione, effettuata in doppio è stata fatta con metodo ELISA sui terreni, trattati preventivamente come descritto nei Metodi, alle diluizioni di 1;50 e 1:250. L'altezza degli istogrammi rappresenta il valore medio (\pm DS) della concentrazione di IgG, misurate in due esperimenti distinti. Soggetto #2: controllo 926.0 ± 243.9 ng/ml, trattato $31.483.7 \pm 2.712.6$ ng/ml. Soggetto #3: controllo 80.8 ± 20.0 ng/ml, trattato: $2.893.1 \pm 220.2$ ng/ml.

DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi si è voluto indagare sugli effetti che le IgG umane non immuni, analoghe a quelle che vengono somministrate per via endovenosa (IVIg) a scopo terapeutico, possono avere a livello dell'endotelio vascolare. Il razionale della ricerca si basa sull'osservazione ampiamente documentata da numerosi lavori clinici e no, che le IVIg esplicano un benefico effetto terapeutico in numerose patologie di natura immunitaria ed infiammatoria (Siragam V, 2006; Durandy A, 2009) anche se, paradossalmente, non se ne conosce bene il meccanismo d'azione. A questo proposito, sono state avanzate numerose ipotesi che non si escludono a vicenda e che riguardano soprattutto gli effetti che le IgG possono avere sulle cellule dell'immunità e sui loro prodotti di secrezione (Tha-In T, 2008; Proulx DP, 2009). E' anche noto che gli effetti terapeutici delle IgG si prolungano spesso oltre il tempo di dimezzamento delle IgG (circa 3 settimane), fatto questo che escluderebbe come possibile un meccanismo di *clearance* passiva o di semplice competizione che le IgG somministrate potrebbero avere nei confronti di anticorpi patologici circolanti e/o verso recettori specifici (Durandy A, 2009).

Dato che le IVIg circolano nel plasma e, oltre che con le cellule dell'immunità, sono costantemente a contatto con le cellule endoteliali vascolari, si è ritenuto importante esaminare questo specifico tipo cellulare come potenziale *target* molecolare delle IgG che non è mai stato finora preso in considerazione negli studi che si sono occupati di questo specifico argomento.

I risultati degli esperimenti condotti sulle HUVECs, prese come modello di cellule endoteliali che conservano in parte le proprietà delle cellule dell'immunità nativa (Carmeliet P, 2000), hanno rivelato una serie di effetti importanti e finora sconosciuti delle IgG, anche in considerazione del fatto che le IgG sono state impiegate ad una concentrazione (0.5 mg/ml) che rientra nel *range* più basso fra quelli misurati *in vivo* dopo somministrazione endovenosa delle IgG. Si è così osservato che le IgG attivano precocemente la via metabolica cellulare IP3/Akt (Figura 19), notoriamente implicata nei processi di proliferazione e differenziamento delle cellule endoteliali (Somanath PR, 2006; Tramentozzi E, 2011) e che questa attivazione è alla base dell'espressione di forme nuove di proteine cellulari come le HSPs 90, 70, 40 e di MMP-9 che risultano anche attivamente secrete (Figura 18, B). E' noto che queste proteine sono coinvolte nei

Discussione

processi di ri-arrangiamento strutturale delle cellule (Eustace BK, 2004) ed in particolare le HSPs 90 e 70 svolgono un ruolo di *chaperones* per alcune forme della MMP-9 che non sono attive proteoliticamente ma che giocano comunque un ruolo importante nei fenomeni di replicazione e metabolismo cellulare (Hartl FU, 1996; Johnson JL, 2012). Nei nostri esperimenti abbiamo visto che le IgG sono in grado di determinare delle modificazioni morfologiche nelle HUVECs compatibili con una trasformazione simil-angiogenetica indotta da queste forme di MMP-9 non attive proteoliticamente e secrete in complessi con le HSPs (Figura 17). Anche se non si possono fare inferenze sulla rilevanza di questo effetto morfologico in relazione alla condizione *in vivo*, non necessariamente esso riveste un significato patologico (Fox SB, 2001; Ferrara N, 1995; Carmeliet P, Jain RK, 2000) per cui possa essere interpretato come un potenziale effetto indesiderato delle IgG. E' da rilevare infatti che la trasformazione simil-angiogenetica osservata sulle HUVECs è un effetto non solo dose-dipendente ma anche tempo-dipendente, in quanto per la sua manifestazione è necessaria un'esposizione continuativa alle IgG. Infatti, l'effetto non è più visibile se le IgG, dopo essere state a contatto con le cellule per il tempo utile ad innescare l'attivazione della via metabolica che porta all'espressione e secrezione delle HSPs e di MMP-9, vengono rimosse dal terreno (Figura 20). In questo caso, si può anche notare che tutte le modificazioni dell'espressione proteica misurate non solo nei lisati cellulari ma anche nel terreno, sono annullate, a riprova del fatto che sono proprio le HSPs e la MMP-9 di nuova sintesi che con effetto paracrino inducono l'alterazione morfologica (Figura 21). Si può quindi ipotizzare che anche *in vivo*, dopo somministrazione endovenosa delle IgG, gli effetti di trasformazione cellulare si possano esplicare solo se l'endotelio è esposto per un tempo sufficientemente lungo ad una determinata concentrazione di IgG.

Il risultato più significativo dei nostri esperimenti riguarda la dimostrazione che le IgG sono in grado di indurre la loro stessa sintesi e secrezione nelle HUVECs che non sono cellule fisiologicamente deputate a questa funzione. Questo effetto non era mai stato rilevato in precedenza, anche se Zhao Y (Zhao Y, 2011) avevano dimostrato che le HUVECs sono in grado di sintetizzare le IgG, ipotizzando così per l'endotelio vasale una funzione che va bene al di là del semplice trasporto delle IgG. L'analisi sui lisati cellulari delle HUVECs esposte alle IgG a tempi diversi di incubazione ha permesso di verificare che l'espressione delle IgG aumentava in funzione del tempo di contatto con le IgG nel terreno, risultando massima dopo 20 h (Figura 22, A) ma, soprattutto, ha

mostrato che anche dopo un tempo di contatto breve (5 h) seguito da un lungo periodo di recupero delle cellule (15 h) senza IgG, lo stimolo di attivazione per la sintesi di IgG si manteneva (Figura 22, A). A conferma del fatto che quanto rilevato con il metodo *Western blotting* sulle cellule non era la conseguenza di un assorbimento passivo delle IgG aggiunte al terreno ma rappresentava una vera e propria sintesi “*ex-novo*”, sono venuti i risultati della misurazione dell’espressione dei geni delle IgG con *real-time PCR*, con l’evidenza dell’incremento di espressione in funzione del tempo di contatto con le IgG (Figura 22, C). In aggiunta a questo, si dimostrava come la sintesi era anche accompagnata da un’attiva secrezione rilevata nelle condizioni in cui le IgG rimanevano a contatto con le cellule solo per un tempo ridotto per poi essere rimosse (Figura 22, B). I nostri risultati relativi a questo specifico aspetto sperimentale ci permettono di concludere che per la sintesi e secrezione di nuove IgG nelle HUVECs è sufficiente una breve stimolazione della via metabolica PI3/Akt da parte delle IgG aggiunte al terreno, stimolazione di per sé non sufficiente invece a determinare la sintesi delle HSPs e della MMP-9 più specificamente correlate con l’induzione delle alterazioni morfologiche. Quindi, la via che porta alla sintesi delle IgG è distinta da quella che porta alla modificazione morfologica delle cellule anche se entrambe sembrano implicare la stimolazione, seppur di entità diversa, della via di segnale cellulare PI3/Akt.

I nostri risultati hanno anche messo in evidenza il ruolo del recettore FcRn nel meccanismo d’azione indotto dalle IgG umane sulle HUVECs. Infatti, solo in presenza di IgG, sia dopo un contatto prolungato come pure parziale con le cellule, si poteva misurare l’espressione del recettore che invece era assente nel controllo (Figura 23, A). Le IgG erano quindi in grado non solo di indurre la loro stessa espressione ma anche quella del recettore deputato al loro specifico trasporto (Roopenian DC, 2007; Goebel NA, 2008), convalidando così l’osservazione che le cellule endoteliali in cui è espresso in misura maggiore il recettore sono in grado di internalizzare più IgG di quanto non facciano quelle in cui il recettore è poco espresso (Goebel NA, 2008). Si può ragionevolmente ipotizzare che l’espressione del recettore nelle HUVECs è funzionale da una parte al trasporto delle IgG aggiunte al terreno e dall’altra anche alla secrezione nel terreno delle IgG sintetizzate “*ex-novo*”. Il riscontro che il recettore veniva anche secreto in associazione con le IgG (Figura 23, B) mette in luce un aspetto tutto nuovo del processo di secrezione delle IgG per cui queste potrebbero anche essere liberate nel mezzo extra-cellulare senza staccarsi dal loro recettore come invece previsto dalla teoria comune per cui il recettore sarebbe riciclato nella cellula e le IgG liberate extra-

Discussione

cellularmente (Roopenian DC, 2007; Rath T, 2013). Il significato di questo riscontro non è chiaro e merita indagini più approfondite. E' da notare anche che all'immunofluorescenza non si è mai messa in evidenza la presenza del recettore nelle cellule esposte alle IgG, le quali venivano visualizzate in formazioni endocitiche di diverse dimensioni a localizzazione citoplasmatica senza alcuna fusione con nucleo e/o membrana cellulare (Figura 24). Il dato, apparentemente in contrasto con quanto osservato al *Western blotting*, può essere spiegato ammettendo che il recettore, pur presente, non era visualizzato in quanto legato stabilmente alle IgG in modo che queste ne mascheravano il sito antigenico non più disponibile quindi per il legame all'anticorpo specifico. Questa possibilità sarebbe anche avvalorata dal fatto che all'*immuno blotting*, metodica che ha permesso di evidenziare il recettore nei lisati cellulari, il recettore compare sempre a pesi molecolari compatibili con la formazione di complessi (Figura 23, A) che invece non sono messi in evidenza all'immuofluorescenza data la diversa modalità tecnica con cui viene rilevata la formazione dell'immunocomplesso. Che il recettore FcRn possa comunque essere coinvolto nella fase di secrezione delle IgG è stato confermato anche negli esperimenti condotti sui PBMCs esposti allo stimolo delle IgG sia in incubazione prolungata (di 12 giorni) che per un tempo parziale (Figura 27). Anche in questo caso, in cui le cellule prese in esame comprendono i linfociti funzionalmente deputati alla sintesi e secrezione di IgG, l'effetto delle IgG è risultatato quello di stimolare la sintesi e secrezione di IgG in aggiunta a quella del suo recettore (Figura 28). Questa concordanza di risultati fa pensare che ci sia un meccanismo comune che regola l'espressione del recettore in associazione a quella delle IgG nelle HUVECs e nei linfociti B, anche se i due tipi cellulari sono distanti da un punto di vista funzionale.

In conclusione, i nostri risultati hanno permesso di individuare un nuovo meccanismo d'azione delle IgG umane che si manifesta a carico delle HUVECs con la conseguenza di indurre la sintesi e secrezione di nuove IgG. Il fenomeno potrebbe avere rilevanza da un punto di vista terapeutico per le applicazioni delle IgG *in vivo* in quanto la produzione di nuovi anticorpi da parte delle cellule endoteliali lambite in continuazione dalle IgG somministrate per via endovenosa, può potenziare e prolungare nel tempo un analogo effetto di stimolazione della produzione invece sulle cellule dell'immunità propriamente deputate a ques

BIBLIOGRAFIA

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002 Maturazione dei linfociti B ed espressione dei geni delle immunoglobuline. In *Immunologia cellulare e molecolare*. pp 81-91 Ed. Piccin

Albanesi M, Daeron M. 2012 The interaction of therapeutic antibodies with Fc receptor. *Immunol Lett* 143(1): 20-27

Anthony RM, Wermeling F, Ravetch JV. 2012 Novel roles for the IgG Fc glycan. *Ann N Y Acad Sci* 1253: 170-180

Arnold JN, Radcliffe CM, Wormald MR, Royle L, Harvey DJ, Crispin M, Dwek RA, Sim RB, Rudd PM. 2004 The glycosylation of human serum IgD and IgE and the accessibility of identified oligomannose structures for interaction with mannan-binding lectin. *J Immunol* 173(11): 6831-6840

Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd Pm, Dwek RA. 2007 The impact of glycosilation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* 25: 21-50

Babbage G, Ottensmeier CH, Blaydes J, Stevenson FK, Sahota SS. 2006 Immunoglobulin heavy chain locus and expression of activation-induced cytidine deaminase in epithelial breast cancer cell lines. *Cancer Res* 15(8):3996-4000

Baerenwaldt A, Nimmerjahn F. 2008 Immune regulation: FcγRIIB--regulating the balance between protective and autoreactive immune responses. *Immunol Cell Biol* 86(6): 482-484

Baker K, Qiao SW, Kuo T, Kobayashi K, Yoshida M, Lencer WI, Blumberg RS. 2009 Immune and non-immune functions of the (not so) neonatal Fc receptor, FcRn. *Semin Immunopathol* 31(2): 223-236

Ballou M. 2011 The IgG molecule as a biological immune response modifier: mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol* 127(2): 315-323

Bibliografia

- Biro A, Herincs Z, Fellingner E, Szilagyi L, Barad Z, Gergely J, Graf L, Sarmay G. 2003 Characterization of a trypsin-like serine protease of activated B cells mediating the cleavage of surface proteins. *Biochim Biophys Acta* 1624(1-3): 60-69
- Boruchov AM, Heller G, Veri MC, Bonvini E, Ravetch JV, Young JW. 2005 Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest* 115(10): 2914-2923
- Boyum A. 1964 Separation of white blood cells. *Nature* 204: 793-794
- Carmeliet P, Jain RK. 2000 Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407(6801): 249-257
- Carmeliet P. 2000 Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6(4): 389-395
- Chaudhuri J, Alt FW. 2004 Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol.* 4(7): 541-552
- Chen Z, Gu J. 2007 Immunoglobulin G expression in carcinomas and cancer cell lines. *FASEB* 21(11):2931-2938
- Cianga P, Cianga C, Cozma L, Ward ES, Carasevici E. 2003 The MHC class I related Fc receptor, FcRn, is expressed in the epithelial cells of the human mammary gland. *Hum Immunol* 64(12): 1152-1159
- Collin M, Shannon O, Bjorck L. 2008 IgG glycan hydrolysis by a bacterial enzyme as a therapy against autoimmune conditions. *PNAS* 105(11): 4265-4270
- Dickinson BL, Badizadegan K, Wu Z, Ahouse JC, Zhu X, Simister NE, Blumberg RS, Lencer WI. 1999 Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. *J Clin Invest* 104(7): 903-911
- Dreyer WJ, Bennett JC. 1965 The molecular basis of antibody formation: a paradox. *PNAS* 54(3): 864-869
- Durandy A, Kaveri SV, Kuijpers TW, Basta M, Miescher S, Ravetch JV, Rieben R. 2009 Intravenous immunoglobulins--understanding properties and mechanisms. *Clin Exp Immunol* 158 Suppl 1: 2-13

Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. 2005 The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci* 118: 2997–3002.

Eustace BK, Jay DG. 2006 Extracellular roles for the molecular chaperone, hsp90. *Cell Cycle* 3(9): 1098-1100

Ferrara N. 1995 The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 36(2): 127-137

Fox SB, Gasparini G, Harris AL. 2001 Angiogenesis: pathological, prognostic, and growth-factor pathways and their link to trial design and anticancer drugs. *Lancet Oncol* 2(5): 278-289

Garfin DE. 1990 One-dimensional gel electrophoresis. In *Guide to protein purification* pp 425-429 Ed. Murray P. Deutcher.

Gelfand EW. 2006 Differences between IGIV products: impact on clinical outcome. *Int Immunopharmacol* 6(4): 592–599

Ghetie V, Hubbard JG, Kim JK, Tsen MF, Lee Y, Ward ES. 1996 Abnormally short half-lives of IgG in beta 2-microglobulin-deficient mice. *Eur J Immunol* 26(3): 690-696

Goebel NA, Babbey CM, Datta-Mannan A, Witcher DR, Wroblewski VJ, Dunn KW. 2008 Neonatal Fc receptor mediates internalization of Fc in transfected human endothelial cells. *Mol Biol Cell* 19(12): 5490-5505

Gornik O, Pavic T, Lauc G. 2012 Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins – implications on evolution and disease. *Biochim Biophys Acta* 1820(9): 1318-1326

Gorus FK, Vandewalle CL, Winnock F, Lebleu F, Keymeulen B, Van der Auwera B, Falorni A, Dorchy H, Féry F, Pipeleers DG. 1998 Increased prevalence of abnormal immunoglobulin M, G, and A concentrations at clinical onset of insulin-dependent diabetes mellitus: a registry-based study. The Belgian Diabetes Registry. *Pancreas* 16(1): 50-59

Hartl FU. 1996 Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381(6583): 571-579

Bibliografia

Hartung HP. 2008 Advances in the understanding of the mechanism of action of IVIg. *J Neurol* 255 Suppl 3: 3–6

Hozumi N, Tonegawa S. 1976 Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *PNAS* 73:3628-3632

Imbach P, Barandun S, d'Apuzzo V, Baumgartner C, Hirt A, Morell A, Rossi E, Schoni M, Vest M, Wagner HP. 1981 High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. *Lancet* 1(8232): 1228–1231

Israel EJ, Wilsker DF, Hayes KC, Schoenfeld D, Simister NE. 1996 Increased clearance of IgG in mice that lack β 2-microglobulin: possible protective role of FcRn. *Immunology* 89: 573-578

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973 Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745-2756

Jefferis R. 2009 Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 8(3): 226-234

Johnson JL. 2012 Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochim Biophys Acta* 1823(3): 607-613

Jovanovic V, Dai X, Lim YT, Kemeny DM and MacAry PA. 2009 Fc gamma receptor biology and systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum Dis* 12(4): 293-298

Jung ST, Kang TH, Kelton W, Georgiou G. 2011 Bypassing glycosylation: engineering aglycosylated full-length IgG antibodies for human therapy. *Curr Opin Biotechnol* 22(6): 858-867

Kimoto Y. 1998 Expression of heavy-chain constant region of immunoglobulin and T-cell receptor gene transcript in human non-hematopoietic tumor cell lines. *Gene Chromosomes Cancer* 22(1): 83-86

Klimovich VB. 2011 IgM and its receptors: structural and functional aspects. *Biochemistry (Mosc)* 76(5): 534-549

- Kuo TT, Aveson VG. 2011 Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics. *MAbs* 3(5): 422-430
- Li X, Ptacek TS, Brown EE, Edberg JC. 2009 Fc γ Receptor: Structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun* 10(5):380-389
- Liu H, Bulseco GG, Sun J. 2006 Effect of post-translational modifications on the thermal stability of a recombinant monoclonal antibody. *Immunol Lett* 106(2): 144-153
- Lobo ED, Hansen RJ, Balthasar JP. 2004 Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci* 93(11): 2645-2648
- Lux A, Aschermann S, Biburger M, Nimmerjahn F. 2010 The pro and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G. *Ann Rheum Dis* 69 Suppl 1: 92-96
- Mimura Y, Church S, Ghirlando R, Ashton PR, Dong S, Goodall M, Lund J, Jefferis R. 2000 The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms. *Mol Immunol* 37(12-13): 697-706
- Mosmann T. 1983 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol. Methods* 65: 55-63
- Murphy K, Travers P, Walport M. 2010 Antigen Recognition by B-cell and T-cell receptors. In Janeway's Immunobiology pp 127-162 Ed. Piccin
- Murphy K, Travers P, Walport M. 2010 The distributions and functions of immunoglobulin classes. In Janeway's Immunobiology pp 408-411 Ed. Piccin
- Murphy LO, Blenis J. 2006 MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31:268-275
- Nezlin R, Ghetie V. 2004 Interactions of immunoglobulins outside the antigen-combining site. *Adv Immunol* 82:155-215
- Nezlin R. 2000 A quantitative approach to the determination of antigen in immune complexes. *J Immunol Methods* 237(1-2): 1-17
- Nezlin R. 2009 Circulating non-immune IgG complexes in health and disease. *Immunol Lett* 122(2): 141-144

Bibliografia

Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2007 The anti-inflammatory activity of IgG: the intravenous IgG paradox. *J Exp Med* 204(1): 11-15

Nimmerjahn F, Ravetch JV. 2008 Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu Rev Immunol* 26: 513-533

Ninfa AJ, Ballou DP. 2000 Metodologie di base per la biochimica e la biotecnologia. Ed. Zanichelli

Novak J, Julian BA, Mestecky J, Renfrow MB. 2012 Glycosylation of IgA1 and pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin Immunopathol* 34(3): 365-382

Orange JS, Hossny EM, Weiler CR, Ballou M, Berger M, Bonilla FA, Buckley R, Chinen J, El-Gamal Y, Mazer BD, Nelson RP Jr, Patel DD, Secord E, Sorensen RU, Wasserman RL, Cunningham-Rundles C; Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. 2006 Use of intravenous immunoglobulin in human disease: a review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. *J Allergy Clin Immunol* 117(4 Suppl): S525-S553

Ostrove S. 1990 Affinity chromatography: General methods. *Guide to protein purification* pp. 357-360 Murray P. Deutcher.

Pagetta A, Tramentozzi E, Corbetti L, Frasson M, Brunati AM, Finotti P. 2007 Characterization of immune complexes of idiotypic catalytic and anti-idiotypic inhibitory antibodies in plasma of type 1 diabetic subjects. *Mol Immunol* 44(11): 2870-2883

Pohl T. 1990 Concentration of proteins and removal of solutes. In *Guide to protein purification* pp 68-78 Murray P. Deutcher.

Proulx DP, Aubin E, Lemieux R, Bazin R. 2009 Spontaneous internalization of IVIg in activated B cells. *Immunol Lett* 124(1): 18-26

Qiao SW, Kobayashi K, Johansen FE, Sollid LM, Andersen JT, Milford E, Roopenian DC, Lencer WI, Blumberg RS. 2008 Dependence of antibody-mediated presentation of antigen on FcRn. *PNAS* 105(27): 9337-9342

- Qiu X, Zhu X, Zhang L, Mao Y, Zhang J, Hao P, Li G, Lv P, Li Z, Sun X, Wu L, Zheng J, Deng Y, Hou C, Tang P, Zhang S, Zhang Y. 2003 Human epithelial cancers secrete Immunoglobulin G with unidentified specificity to promote growth and survival of tumor cells. *Cancer Res.* 63(19): 6488–6495
- Radaev S, Motyka S, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Sun PD. 2001 The structure of human type III Fcγ receptor in complex with Fc. *J Biol Chem* 276(19): 16469-16477
- Raghavan M, Wang Y, Bjorkman PJ. 1995 Effects of receptor dimerization on the interaction between the class I major histocompatibility complex-related Fc receptor and IgG. *PNAS* 92(24): 11200-11204
- Raju T, Scallon B. 2006 Glycosylation in the Fc domain of IgG increases resistance to proteolytic cleavage by papain. *Biochem Biophys Res Commun* 341(3): 797-803
- Raju T, Scallon B. 2007 Fc glycans terminated with N-acetylglucosamine residues increase antibody resistance to papain. *Biotechnol Prog* 23(4): 964-971
- Rangan SK, Liu R, Brune D, Planque S, Paul S, Sierks MR. 2003 Degradation of beta-amyloid by proteolytic antibody light chains. *Biochemistry* 42(48): 14328-14334
- Rath T, Kuo TT, Baker K, Qiao SW, Kobayashi K, Yoshida M, Roopenian D, Fiebiger E, Lencer WI, Blumberg RS. 2013 The immunologic functions of the neonatal Fc receptor for IgG. *J Clin Immunol* 33 Suppl 1: 9-17
- Rojas R, Apodaca G. 2002 Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(12):944-955
- Roopenian DC, Akilesh S. 2007 FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7(9): 715-725
- Saldoval R, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM. 2008 Glycosylation changes on serum glycoproteins in ovarian cancer may contribute to disease pathogenesis. *Dis Markers* 25(4-5): 219-232
- Schuck P, Radu CG, Ward ES. 1999 Sedimentation equilibrium analysis of recombinant mouse FcRn with murine IgG1. *Mol Immunol* 36(15-16): 1117-1125

Bibliografia

Simister NE, Jacobowitz Israel E, Ahouse JC, Story CM. 1997 New functions of the MHC class I-related Fc receptor, FcRn. *Biochem Soc Trans* 25:481–486

Siragam V, Crow AR, Brinc D, Song S, Freedman J, Lazarus AH. 2006 Intravenous immunoglobulin ameliorates ITP via activating Fc gamma receptors on dendritic cells. *Nat Med* 12(6): 688-692

Somanath PR, Razorenova OV, Chen J, Byzova TV. 2006 Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle* 5(5): 512-518

Stetler-Stevenson WG. 1999 Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 103(9): 1237-1241

Stoscheck CM. 1990 Quantitation of proteins. *Guide to protein purification* 50-68. Murray P. Deutcher

Svensson J, Eising S, Mortensen HB, Christiansen M, Laursen I, Lernmark Å, Nilsson A, Simonsen LB, Carstensen B, Pociot F, Johannesen J; Danish Childhood Diabetes Registry. 2012 High levels of immunoglobulin E and a continuous increase in immunoglobulin G and immunoglobulin M by age in children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Hum Immunol* 73(1):17-25

Telleman P, Junghans RP. 2000 The role of the Brambell receptor (FcRB) in liver: protection of endocytosed immunoglobulin G (IgG) from catabolism in hepatocytes rather than transport of IgG to bile. *Immunology* 100:245–251.

Tha-In T, Bayry J, Metselaar HJ, Kaveri SV, Kwekkeboom J. 2008 Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin. *Trends Immunol* 29(12): 608-615

Timmons TM, Dunbar BS. 1990 Protein blotting and immunodetection. In *Guide to protein purification* pp 679-682. Murray P. Deutcher.

Tramontozzi E, Montopoli M, Orso G, Pagetta A, Caparrotta L, Frasson M, Brunati AM, Finotti P. 2008 Stable complexes formed by Grp94 with human IgG promoting angiogenic differentiation of HUVECs by a cytokine-like mechanism. *Mol Immunol* 45(13): 3639-3648

Tramentozzi E, Pagetta A, Frasson M, Brunati AM, Montopoli M, Finotti P. 2009 Angiogenic transforming capacity of IgG purified from plasma of type 1 diabetic patients. *J Cell Mol Med* 13(7): 1336-1347

Tramentozzi E, Tibaldi E, Brunati AM, Pagetta A, Finotti P. 2011 Crucial role of HSP90 in the Akt-dependent promotion of angiogenic-like effect of glucose-regulated protein94 (Grp94)-IgG complexes. *J Cell Mol Med* 15(12): 2768-2780

Vladutiu AO. 2000 Immunoglobulin D: properties, measurement and clinical relevance. *Clin Diagn Lab Immunol* 7(2): 131-140

Weeks JC, Tierney MR, Weinstein MC. 1991 Cost effectiveness of prophylactic intravenous immune globulin in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 325(2): 81-86

Wilson K, Walker J. 1995 Metodologia biochimica. Raffaello Cortina ed.

Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. 2012 Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol* 12(7): 517-531

Zhao Y, Liu Y, Chen Z, Korteweg C, Gu J. 2011 Immunoglobulin g (IgG) expression in human umbilical cord endothelial cells. *J Histochem Cytochem* 59(5): 474-488

Zhu X, Meng G, Dickinson BL, Li X, Mizoguchi E, Miao L, Wang Y, Robert C, Wu B, Smith PD, Lencer WI, Blumberg RS. 2001 MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *J Immunol* 166(5): 3266-3276

Zhu X, Peng J, Raychowdhury R, Nakajima A, Lencer WI, Blumberg RS. 2001 Neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells. *Biochem J* 367: 703-714

