

UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



**Dottorato Di Ricerca in
DERMATOLOGIA SPERIMENTALE**

XXI Ciclo

Coordinatore: Prof. Fabio Ayala

TESI DI DOTTORATO

**Analisi della componente glicanica di Aptoglobina
in pazienti affetti da Psoriasi**

**TUTOR
Chiar.mo
Prof. Fabio Ayala**

**CANDIDATA
Dott.Maresca Bernardetta**

Alle mie sorelle

INDICE

1.INTRODUZIONE	5
1.1. Glicomica	5
1.1a. Variazioni glicaniche delle proteine	10
1.2. Aptoglobina struttura	13
1.2a. Aptoglobina: funzioni	16
1.2b. Variazioni glicaniche di Hpt	19
1.3a. Pelle come sistema immunitario	21
1.3b. Psoriasi	23
1.3c. Psoriasi: meccanismi molecolari	25
2.MATERIALI E METODI	28
2.1a Materiali	28
2.1b Donatori e considerazioni cliniche	29
2.2 Metodi	29
2.2.1 Purificazione di aptoglobina	29
<i>a) Cromatografia di affinità</i>	
<i>b) Salting out delle proteine plasmatiche</i>	
<i>c) Gel filtrazione</i>	
2.2.2 Elettroforesi	32
<i>a) SDS-PAGE in condizioni denaturanti e riducenti</i>	
<i>b) SDS-PAGE in condizione denaturanti e non riducenti</i>	
<i>c) 2D-Elettroforesi</i>	
2.2.3 Densitometria quantitativa	34
2.2.4 Procedura ELISA	35
<i>a) Titolazione di Hpt</i>	
<i>b) Valutazione del legame di Hpt a proteine (ApoAI, ed Hb)</i>	
<i>c) Valutazione del legame di Hpt a lectine</i>	
2.2.5 Preparazione del proteo liposoma	38
2.2.6 Saggio LCAT	40
2.2.7 Analisi statistica	40
2.2.8 Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF)	41
2.2.9 Analisi delle catene glicaniche	42
<i>a) Rimozione degli zuccheri da Hpt mediante PNGasi F</i>	
<i>b) Derivatizzazione della catena glicanica</i>	
<i>c) HPLC</i>	
2.2.10 Estrazione della miscela proteica dalla lesione psoriasica	44
3.RISULTATI E CONSIDERAZIONI	45
3.1.1 Titolazione di Hpt in plasmidi di psoriasici e donatori sani	45
3.1.2 Prevalenza fenotipica di Hpt in psoriasi	47
3.1.3 Analisi comparativa dei contaminanti di Hpt in psoriasi e in condizioni fisiologiche	48
3.1.4 Binding di Hpt ad emoglobina e ApoA-1	50
3.1.5 Binding di Hpt ad ApoA-1 mediante dosaggio enzimatico di LCAT	53
3.1.6 Commenti e considerazioni	55
3.2.1 Elettroforesi bidimensionale	57

3.2.2 Analisi MALDI dei glicopeptidi	59
3.2.3 Analisi HPLC delle catene glicaniche	61
3.2.4 ELISA con lectine	64
3.2.5 Commenti e considerazioni	67
4.CONCLUSIONI	71
5. BIBLIOGRAFIA	I

Introduzione

1.1 Glicomica

La glicobiologia è un'area della biologia che studia le catene glicaniche presenti su proteine e lipidi, con lo scopo di identificare una relazione tra strutture glicaniche e funzionalità delle proteine (Raman R. et al., *Nature Meth.* 2005). Ciò che suscita interesse, verso questo tipo di studio, sono le numerose scoperte con le quali si attribuisce ai glicani un ruolo determinante in fasi di crescita e differenziamento cellulare (Hwang HY et al., *Nature* 2003), comunicazione tra cellule (Collins BE. et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004), risposta immunitaria (Miller SI. et al., *Nat. Rev. Microbiol.* 2005) ecc... Inoltre, è ormai indubbio che un determinato codice glicanico di specifici segnali proteici o recettori cellulari può influenzare il destino di tessuti e organi (Lowe JB. and Marth JD., *Annual. Rev. Biochem.* 2003).

La glicosilazione delle proteine è un evento post-traduzionale determinato da una serie di processi, che si concludono con il montaggio di una catena di carboidrati su uno specifico amminoacido. I compartimenti cellulari coinvolti in tale processo sono il Reticolo endoplasmatico rugoso e l'apparato di Golgi, entrambi sede di numerosissime glicosil-trasferasi.

In base alla loro struttura chimica, i glicani possono essere classificati in lineari o ramificati. La maggior parte degli zuccheri lineari sono i glucosaminoglicani che presentano unità ripetute di disaccaridi solfatati, ancorati come catene polisaccaridiche a residui di Ser o Thr (perciò dette O-linked) a formare aggregati di proteoglicani. Le catene ramificate si differenziano invece in due gruppi: O-linked e N-linked. In particolare, le catene glicaniche N-linked hanno legami con il gruppo ammidico della asparagina (Asn) presente nella sequenza aminoacilica della proteina; quelle O-linked, invece, sono legate al gruppo ossidrilico di serina (Ser), treonina (Thr) o idrossilisina (LysOH) (**Fig. 1**).

Relativamente pochi sono i tipi di zuccheri coinvolti nella formazione delle catene glicaniche; alcuni di essi, in particolare, sono caratteristici per il tipo di catena formata, cioè, N-linked, O-linked o lineare.

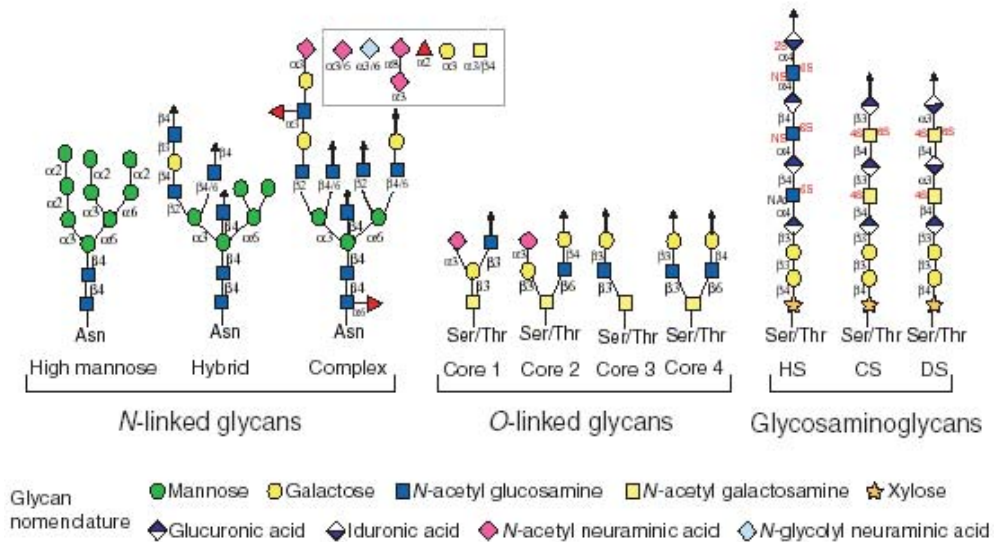


Fig. 1 Tipi di catene glicaniche (N-/O-linked). Il montaggio delle catene glicaniche di tipo N-linked parte con la formazione del legame tra il gruppo -OH dell' NAcGlc e il gruppo NH₂ dell'asparagina. Per le catene glicaniche di tipo O-linked, invece il legame di ancoraggio è tra -OH di NAcGal e il gruppo -OH di serina o treonina. Per i glucosaminoglicani, invece, la catena parte con il legame tra il gruppo ossidrilico dello xilosio e il gruppo ossidrilico di serina o treonina.

In particolare, le ramificazioni N-linked, prese in esame in questo lavoro di tesi sperimentale, sono formate dalla combinazione, più o meno prevedibile, di soli cinque tipi di zuccheri che sono: mannosio (Man), N-acetilglucosammina (NAcGlc), galattosio (Gal), fucosio (Fuc) e acido sialico o neuroaminico (S). In tali strutture si riconosce una porzione invariante, e quindi peculiare a tutte le *N-glycan chain*, costituita da un gruppo N-N-diacetilchitobiosio e da un core di mannosio (**Fig. 2**).

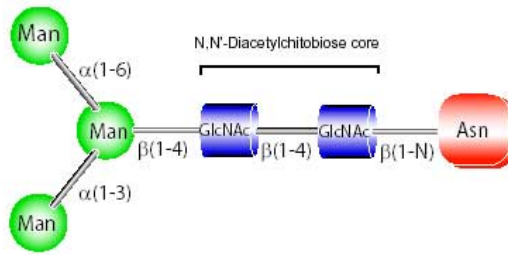


Fig. 2 Porzione invariante delle N-linked chain.

L'aggiunta successiva degli altri zuccheri, conferisce variabilità alla catena visto che dalla loro combinazione si possono generare circa 35560 tipi di tetrasaccaridi differenti. Nella maggior parte dei casi, il mannosio può essere seguito in tutte e tre le posizioni da un residuo di N-acetil glucosammin Core di mannosio quando esso si lega ad un Man laterale, va a costituire la base della ramificazione glicanica, mentre, quando legato al Mann centrale è detto in posizione "bisecting" e non prevede l'aggiunta di ulteriori zuccheri. La catena prosegue con l'aggancio di Gal su entrambe le ramificazioni e si conclude con due S per formare un glicano biantennario completo (**Fig. 3**).

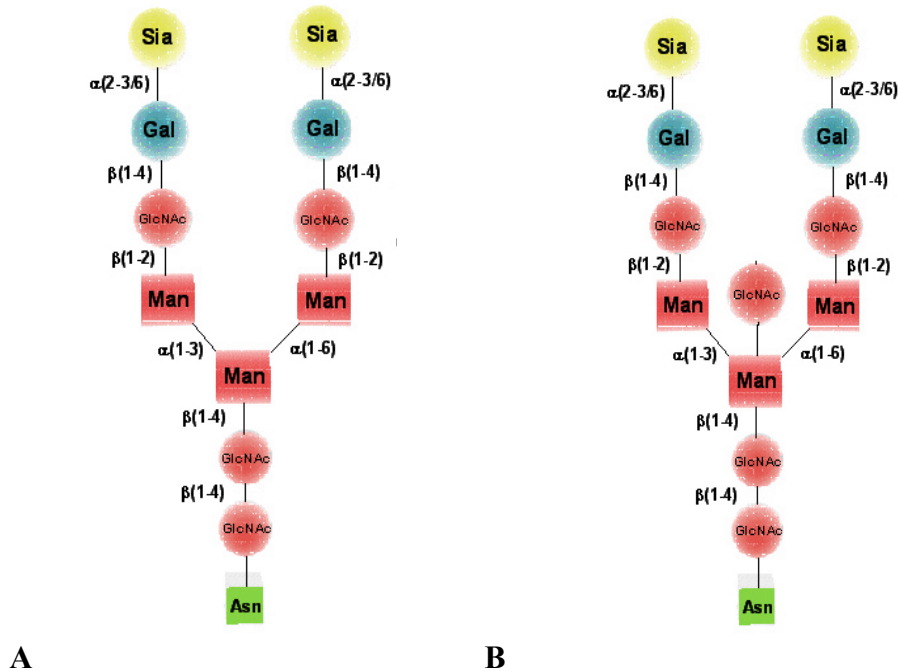


Fig. 3 Catena glicanica N-linked: A) tipo biantennario (A2G2S2); B) tipo biantennario con NAcGlc in posizione *bisecting*.

Il montaggio di un oligosaccaride complesso, durante il processo di glicosilazione, può generare una differenza significativa nella massa di una proteina: spesso, infatti, le glicoproteine hanno una massa molto maggiore di quella che ci si potrebbe aspettare dalla loro sequenza primaria. Non si conoscono ancora le basi dell'informazione per cui ogni proteina subisce un particolare tipo di maturazione e glicosilazione, anche se si suppone che esse risiedono nella struttura della catena polipeptidica della proteina. Il significato della glicosilazione delle proteine è molteplice. In alcuni casi le unità saccaridiche svolgono un ruolo strutturale; ad esempio, quelle presenti a livello della membrana citoplasmatica sono implicate nell'adesione cellulare. Un altro possibile ruolo potrebbe essere quello di favorire il ripiegamento della proteina in una particolare conformazione nonché consentire il legame con specifici recettori di membrana o con la matrice extracellulare.

Sebbene lo studio delle variazioni delle catene glicaniche, intesa sia come composizione della catena che come complessità della stessa, sia molto stimolante e promettente, numerose sono le difficoltà che esso comporta. Innanzi tutto è ancora molto complesso costruire catene glicaniche sintetiche, essendo queste il risultato dell'espressione coordinata, e non facilmente controllabile, di numerose glicosiltrasferasi, molte delle quali tessuto specifiche (Flukae K. et al., Glycoconj. J. 2004). La complessità della biosintesi e la difficoltà nella correzione di eventuali errori conferisce, *in vivo* quanto *in vitro*, eterogeneità alle strutture glicaniche, pur essendo queste il risultato della combinazione di soli cinque zuccheri (Flukae K. et al., Glycoconj. J. 2004). L'eterogeneità delle catene glicaniche, inoltre, non solo è data da una diversa successione di singoli zuccheri ma dal tipo di legame che essi instaurano gli uni con gli altri. Il tipo di legame che c'è tra i diversi zuccheri influenza enormemente il grado di ramificazione di una catena. La glicobiologia ha pertanto richiesto lo sviluppo di nuove tecniche, visto che glicoforme di una stessa proteina, pur essendo isolate dallo stesso tessuto o comparto cellulare, sono da considerare come una miscela eterogenea di strutture chimiche. Un ulteriore approccio per lo studio dei glicani è di tipo genetico e richiede l'utilizzo di organismi *Knock out* o

knock in per specifici enzimi in modo da definirne gli effetti. Studi in tal senso sono stati condotti in topi *knock out* per gli enzimi NAcGlc- e NAcGlc-trasferasi, quest'ultimo coinvolto nelle prime fasi della biosintesi delle catene glicaniche. In tali topi, si sono evidenziati 'fenotipi gravi' come difetti nello sviluppo, disfunzioni del sistema immunitario e, in alcuni casi, morte embrionale (Guo HB. et al., FEBS Lett. 2008). La quantità e la varietà degli studi riguardanti i meccanismi biologici in cui sono coinvolti i carboidrati ha determinato lo sviluppo di due diverse discipline, tra loro comunque correlate: una, più applicativa, diretta alla produzione di farmaci e di prodotti per la diagnostica medica, l'altra, più di base, intesa a comprendere meglio il ruolo dei carboidrati nei vari meccanismi in cui questi sono implicati. Un ruolo determinante, nello sviluppo di queste discipline, è svolto dalla chimica organica nei suoi due aspetti: analitico e sintetico. L'aspetto analitico è evidente: è necessario conoscere innanzitutto le strutture, quella primaria e secondaria, della molecola per poi comprenderne la funzione. Questo è molto difficile, a causa delle piccolissime quantità disponibili in natura e delle complessità strutturali intrinseche di queste molecole. Anche applicando tecniche analitiche sofisticate, la quantità di materiale disponibile non permetterebbe comunque lo studio sulla loro funzione biologica. Per comprendere i meccanismi di interazione tra i siti recettoriali e il materiale proteico, è necessaria la sintesi di prodotti naturali, quanto di prodotti adeguatamente modificati. Collegato a questo aspetto sono ovviamente quelle ricerche di base volte alla messa a punto di metodologie sintetiche per la formazione del legame glicosidico, sempre più selettive ed efficienti, che permettano quindi rese sempre più alte. Le sintesi enzimatiche, chemoenzimatiche ed in fase solida sono attualmente oggetto di grande interesse, così come lo sono le ricerche sulla caratterizzazione di nuovi enzimi o di enzimi geneticamente modificati, atti a sintetizzare il legame glicosidico con elevata selettività.

La glicobiologia tende, quindi, ad affrontare problemi di primaria importanza per la comprensione di meccanismi indispensabili alla vita e per identificare nuove attività di proteine da sempre esistenti nell'organismo. Tali studi hanno, per questo, ampie ricadute nel campo della salute umana,

per la delucidazione della patogenesi di numerose malattie e per lo sviluppo di contromisure adeguate (farmaci, vaccini, biosensori, kit diagnostici).

1.1a Variazioni glicaniche delle proteine

La glicobiologia ha portato numerose innovazioni sia in campo biomedico che nella ricerca di base. L'interesse destato per questo settore di ricerca è legato alla evidenza che il codice glicanico non solo influenza l'attività delle proteine ma che una aberrante composizione delle catene glicaniche è strettamente correlata a numerose patologie, come malattie autoimmuni, e all'insorgenza e progressione di tumori.

In condizione fisiologiche, il codice glicanico è coinvolto in processi di riconoscimento molecolare, come nel caso di infezioni batteriche o virali, adesione cellulare, innesco di processi infiammatori e altri eventi di comunicazione cellulare (Helenius A. et al., *Ann. Rev. Biochem.* 2004).

I cambiamenti a cui può andare incontro una catena glicanica complessa, di tipo N-linked, possono essere: aumento del numero di ramificazioni; variazioni nel tipo di legame chimico che gli zuccheri instaurano tra loro e l'aggancio di zuccheri nuovi all'interno della catena. Non è chiaro, però, se tali modifiche sono dovute ad un cattivo funzionamento degli enzimi responsabili della formazione della catena o se questi ultimi rispondono correttamente ad uno specifico e nuovo segnale genetico.

Un tipo di variazione a cui una catena glicanica va spesso incontro è il tipo di legame che uno zucchero instaura con quello che lo precede. Per esempio, l'acido sialico può formare, con lo zucchero che lo precede, due tipi di legami chimici diversi, cioè legami glicosidici "α 2-3" o "α 2-6" generando diversi epitopi sialati di una stessa proteina. Tuttavia, è noto che solo ed esclusivamente il legame glicosidico "α 2-6" del residuo sialico è capace di promuovere l'attivazione dei linfociti B in processi infiammatori, l'attivazione dei macrofagi e la produzione di β-amiloide da parte di ligandi (Hennet T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; Nakagawa K. et al., J.

Neurochem. 2006). Il residuo diacido sialico terminale “ α 2-6” risulta essere, infatti, un requisito strutturale specifico per ligandi di numerosi recettori di membrana, la cui attivazione determina l’innescio di una cascata di reazioni nella cellula bersaglio. Variazioni strutturali, che riguardano questo tipo di legame glicosidico, rendono il ligando incapace di adempiere le proprie attività.

Variazioni a livello del *core* di mannosio, intese come aumento del numero di ramificazioni (**Fig. 5**) che costituiscono le catene glicaniche, invece, sono generalmente associate a tumori e malattie autoimmuni.

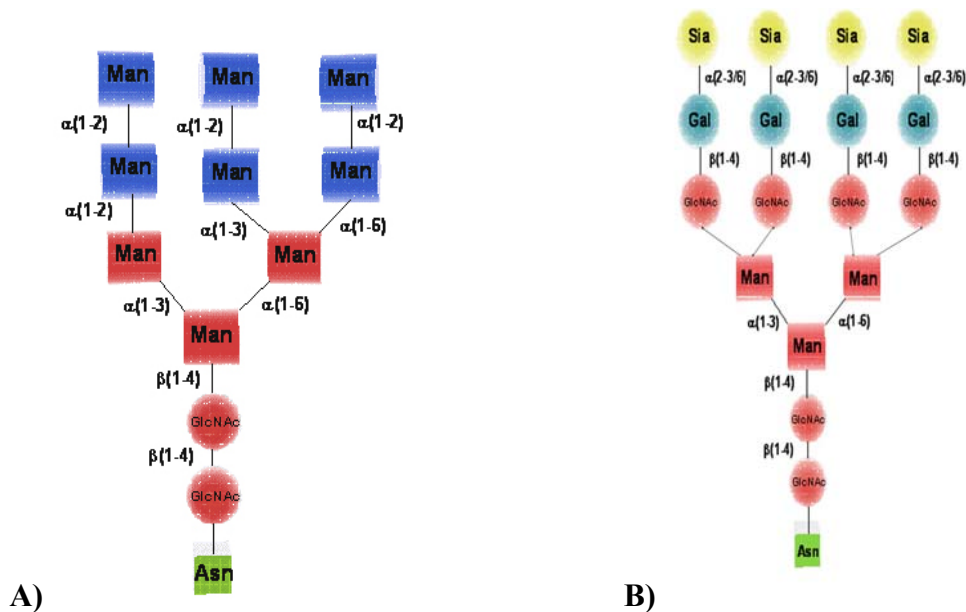


Fig. 5 Tipi di ramificazioni complesse di catene glicaniche N-linked. A) catena glicanica definita *high mannose*; B) catena glicanica di tipo tetraantennaria.

Un sistema modello, per comprendere come lo stato di glicosilazione influenza l’attività di una proteina, è dato dalle IgG. Queste hanno un unico sito di N-glicosilazione; tuttavia, quelle non glicosilate, presenti in circolo in artrite reumatoide, non conservano la capacità di attivare il complemento (Yoshiki Y. et al., Biochem. and Biophysica Acta 2006).

Uno zucchero, invece, la cui presenza o assenza all’interno delle catene glicaniche è fortemente correlata a malattie autoimmuni e cancro, è il fucosio. In catene glicaniche complesse N-linked, il fucosio può

generalmente essere legato al primo residuo NAcGlc del dichitobiosio o al residuo di NAcGlc presente su una ramificazione; in quest'ultimo caso si forma una specifica catena, chiamata Sialyl Lewis x (sLe^x) (**Fig. 6**).

Quest' ultimo tipo di ramificazione è presente, su numerose proteine, in casi di infiammazione acuta e cronica (Van Dijk W. et al., Glycoconj. J. 1995).

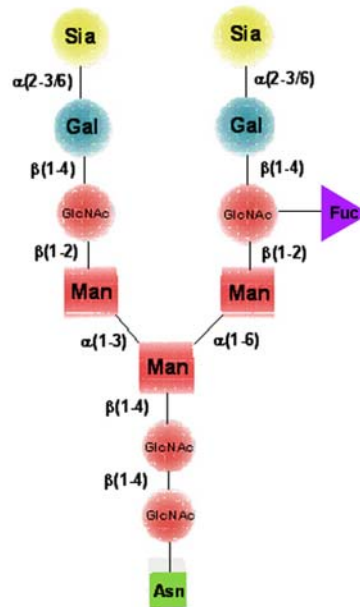


Fig. 6 Catena glicanica Sialyl Lewis: Il legame glicosidico che si forma tra il NAcGlc e il Fuc è di tipo “ α 1-3”

L'espressione di tale catena serve a contrastare la progressione di patologie, visto che trattamenti con sLe^x solubile possono contrastare l'infiammazione indotta da danni tissutali (Mulligan MS. et al., Nature 1993). Ciò è dovuto al fatto che tale zucchero, presente su glicoproteine della membrana leucocitaria o di cellule metastatiche, interagisce con le selectine E, presenti a livello delle pareti endoteliali vascolari. Il riconoscimento tra sLe^x e la selectina E consente il rolling leucocitario, che precede l' extravasazione del leucocita dal circolo ematico (diapedesi). L'aumento di molecole con tale catena glicanica impedisce l'interazione del recettore della cellula endoteliale (cioè la selectina E) con lo specifico ligando sito sulla membrana leucocitaria (Engers HE. et al., J. Canc. Res. Clin. Oncol. 2000). L'applicazione, in campo farmaceutico, di tale scoperta è stata la produzione

di un glico-liposoma su cui è stato inserito il glicano in questione: questo prodotto, impedendo il richiamo di nuovi linfociti, tende a silenziare i processi infiammatori (Stahn R. et al., *Tumor. Biol.* 2000).

Le variazioni glicaniche sono a carico di numerosissime proteine, tra cui quelle della fase acuta della risposta infiammatoria. Ad esempio, proteine come l' α_1 anti-chimotripsina o l'inibitore α_1 della proteasi acida presentano, in patologie come l'artrite reumatoide o il lupus erythematosus, una diminuzione della ramificazione glicanica e un aumento dell'espressione del glicano sLe^x o della fucosilazione alla base della catena (Van Dijk W. et al., *Glycoconj. J.* 1995). Un'altra proteina della fase acuta, presente nel circolo ematico di tutti i mammiferi, la cui glicosilazione è spesso soggetta a variazioni, in condizioni patologiche, è stata presa in esame in questo lavoro di tesi sperimentale: essa è l'Aptoglobina.

1.2 Aptoglobina struttura

L' Aptoglobina (Hpt) è una α_2 -glicoproteina sintetizzata dal fegato sotto lo stimolo di vari fattori tra cui IL-1, IL-6 e TNF (Tumor necrosis factor). Queste citochine sono prodotte dai macrofagi, durante le prime fasi dell'infiammazione; ciò rende conto degli aumentati livelli plasmatici di questa proteina durante tale evento. Hpt, che presenta tre fenotipi nell'uomo (Hpt 1-1, Hpt 1-2 e Hpt 2-2), è una proteina oligomerica, con ciascun monomero costituito da una subunità pesante (detta β) ed una subunità leggera (detta α_1 o α_2). Mentre la catena β , che ha un PM di 40 KDa (Kurosky A. et al., *Biochem.* 1980), è invariante, la catena α è prodotta da almeno tre alleli: Hpt^F, Hpt^{1S}, Hpt². Le due subunità α_1F (fast) e α_1S (slow) differiscono solo per il residuo di amminoacido in posizione 54, in cui c'è rispettivamente un residuo di lisina o glutammato, ed hanno PM intorno a 8.9 KDa. La subunità α_2 , invece, risulta dalla fusione delle due catene leggere (fast e slow), probabilmente generata da un crossing-over ineguale (Bowman BH. and Kurosky A., *Adv. Hum. Genet.* 1982), ed ha PM di 16 KDa (Black A. and Dixon GH, *Nature* 1968). Le conseguenze di questo allele pesante della catena α sono molteplici e rendono gli studi su Hpt

umana molto complessi (**Fig. 7**). Per comprendere tale complessità, è necessario chiarire peculiarità strutturali responsabili non solo del fenotipo ma anche dell'eterogenità oligomerica di Hpt. Il monomero $\alpha\beta$ si forma tramite un ponte disolfuro tra le due diverse subunità, mentre il dimero $\alpha\beta$ - $\alpha\beta$ è costituito da monomeri legati con un altro ponte disolfuro, ma formato tra le due catene α . Ora, mentre α_1F e α_1S sono monovalenti, cioè possono formare un solo ponte disolfuro con un'altra catena α , α_2 è bivalente. Ne consegue che, a seconda del fenotipo espresso (Hpt 1-1 o Hpt 2-2 in omozigosi; Hpt 1-2 in eterozigosi), si potranno avere i seguenti tipi di molecole: (M= monomero monovalente; D = monomero divalente)

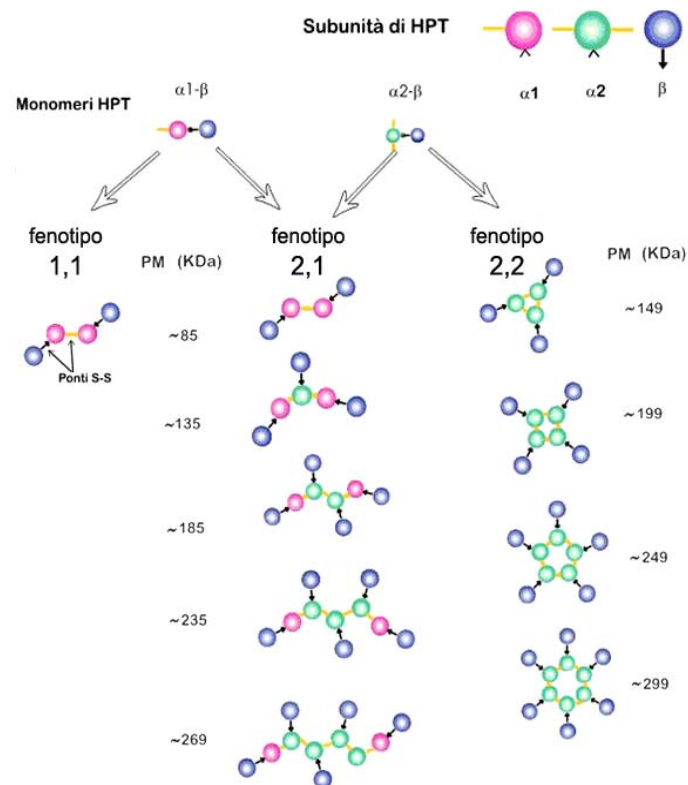


Fig. 7 Rappresentazione schematica dell' assemblaggio dei monomeri di Hpt.

Se, quindi, il dimero (85 kDa) è l'unica forma di Hpt che si può ritrovare nei plasmi di persone con fenotipo Hpt 1-1, nei plasmi Hpt 1-2 e, soprattutto, in quelli con Hpt 2-2 saranno presenti un gran numero di isoforme di diverso PM (da 86 a 334 kDa per Hpt 1-2; da 149 a 384 kDa per Hpt 2-2).

Per ciascuna delle isoforme di Hpt, è possibile ritrovare in circolo un gran numero di glicoforme della proteina. Infatti Hpt presenta, esclusivamente sulla subunità β , quattro possibili siti di N-glicosilazione. Le catene glicaniche si trovano tutte nella regione definita dalla sequenza aminoacidica 19-102. In dettaglio, gli zuccheri sono ancorati a residui di asparagina in posizione 23, 48, 50 e 80 (**Fig 8**).

F(19102) :
VSHHNLTTGATLINEQWLLTTAKNLF~~N~~HSE~~N~~ATAK
DIAPTLTLYVGKKQLVEIEKVVLHP~~N~~YSQVDIGLIKLK
QKVS~~N~~NERVM

Fig. 8 Sequenza amminoacidica della subunità β di Hpt che presenta i 4 siti di N-glicosilazione.

Le catene glicaniche di Hpt sono prevalentemente bi-antennarie e triantennarie, anche, se in numerose patologie, esse vanno incontro a modifiche quali l'aggiunta di fucosio e l'aumento di ramificazione della catena. In condizioni fisiologiche, tutti e quattro i siti di glicosilazione sono occupati; infatti, un ridotto numero di catene glicaniche si riscontrano in casi patologici come nella sindrome "carbohydrate-deficient glycoprotein" (Ferens SM. et al., Glycoconj. J. 1999). Come tutte le proteine con glicani N-linked, Hpt presenta una porzione invariante di catena glicidica, da cui dipartono ramificazioni. Ad ogni mannosio terminale del core si possono agganciare fino ad un massimo di 2 NAcGlc a formare ramificazioni tetra-antennarie. Ogni catena può essere successivamente accresciuta da Galattosio e terminare con un residuo di acido sialico. Il legame che S instaura con Gal può essere, come sopra descritto, di tipo α 2-6 o α 2-3 glicosidico; tuttavia, la forma maggiormente espressa, in condizioni fisiologiche, è quella con S " α 2-6". Quest'ultimo fa sì che la proteina sia capace di interagire con il recettore di membrana CD22 (Mai Z. and Ajit V. Glycoconj. J. 2004). CD22 è una glicoproteina di membrana dei linfociti B maturi (Cyster LG. and Goodnow CC. Immunity 1997), la cui attivazione, da parte di Hpt, inibisce l'adesione cellulare con l'ambiente circostante (El-Ghmati SM. et al., Scand. J. Immunol. 1996). Un'altra particolarità di Hpt è la presenza, sulla catena glicanica, di fucosio. Esso può essere ancorato sia

al residuo di NAcGlc, che forma il *manicotto* della catena, sia a quello presente su una delle ramificazioni, a formare un sLe^x. Anche in questo caso, però, un incremento di glicoforme di Hpt fucosilate è associato a numerosissime patologie. In seguito saranno esposte le maggiori modifiche a cui tale proteina va incontro, quando espressa in condizioni patologiche.

1.2a Aptoglobina: funzioni

Hpt è una proteina ampiamente studiata, perché in circolo svolge molteplici attività.

La funzione principale che essa svolge è quella di legare l'emoglobina (Hb), rilasciata durante l'emolisi, per trasportarla al fegato, così da ridurre i potenziali danni ossidativi del ferro libero e riciclarlo per l'emopoiesi. Questa affermazione richiede un opportuno cenno esplicativo, come segue.

Come è noto, Hb è una proteina tetrameric (α₂β₂) contenente un anello protoporfirinico complessato con Fe²⁺ (eme), che lega l'ossigeno a livello polmonare e lo porta in circolo ai vari distretti del corpo; se rilasciata in circolo, in caso di emolisi (elevata in seguito ad una forte infiammazione), Hb ha un'intensa attività ossidante: essa è in grado di produrre, grazie allo ione ferroso, radicali ossidilici a partire da H₂O₂. Il legame Hb-Hpt sembra coinvolgere solo legami non covalenti, vista l'inibizione per mezzo di polielettroliti (Rogers PD. et al., Biochem. 1998); esso coinvolge la sola catena β di Hpt, che si lega stechiometricamente ad un dimero αβ di Hb. Tale legame sembra intensificare l'attività perossidasi di Hb, ma ne evita la deposizione a livello dei glomeruli renali: il complesso Hb-Hpt è troppo grande, infatti, per passare o restare imprigionata attraverso le maglie del setaccio glomerulare. Il complesso Hb-Hpt, inoltre, permette la rapida rimozione del gruppo eme ad opera del fegato e, in parte, anche del midollo spinale e della milza. Dunque, Hpt, dovrebbe contribuire a prevenire danni ossidativi in circolo. Un'altra funzione di Hpt è quella di legare l'apolipoproteina A1 (ApoA-I), proteina maggioritaria delle HDL. Studi precedenti l'inizio di tale lavoro sperimentale, effettuati presso lo stesso laboratorio in cui la tesi è stata svolta, hanno dimostrato che, in seguito al

legame Hpt-ApoA1, viene ridotta l'attività dell'enzima *Lecitin colesterolo acil trasferasi* (LCAT), la cui funzione è necessaria per il normale svolgimento del trasporto inverso del colesterolo (Balestrieri M. et al., M. Rep. Dev. 2001). L'enzima LCAT, infatti, esterifica il colesterolo (C) in esteri del colesterolo (CE). In dettaglio, Hpt lega l'elica 6 di ApoA-I (aa 143-164) sulla sequenza che va da Leu141 a Ala164 (Spagnuolo MS. et al., Biol. Chem. J. 2005). Questa sequenza è coinvolta anche nell'attivazione dell'enzima; è proprio in seguito a tale competizione con LCAT, per il legame ad ApoA-1, che Hpt inibisce l'enzima. Quindi, l'aumento di Hpt in circolo può avere effetti negativi sul corretto funzionamento del trasporto inverso del colesterolo e stimolare l'insorgenza e la progressione dell'aterosclerosi. D'altro canto, è stato dimostrato che, in una malattia infiammatoria cronica come l'artrite reumatoide, un'elevata concentrazione di Hpt è associata ad una diminuita attività di LCAT ed all'aumento dello spessore della tunica intima-media della carotide (Cigliano L. et al., Arc. Biochem. Biophys. 2005).

Ulteriori attività di Hpt sono quelle di promuovere l'angiogenesi (Cid MC. et al., J. Clin. Invest. 1993), inibire la sintesi di prostaglandine (Jue DM. et al., Moll. Cell. Biochem. 1983; Beisambaeva et al., FEBS Lett. 1990) e l'attività della catepsina B (Snellman O. et al., Nature 1967).

Inoltre, è stato dimostrato che Hpt ha una potente attività antinfiammatoria (El Ghmati SM. Immunol. et al., 1996) e immunosoppressiva (Oh SK. et al., Cancer Res 1987; Quaye OK. et al., J. Infect. Dis. 2000). Per esempio, bloccando il recettore CD22 presente sulle cellule B (Hanasaki K. et al., 1995 J. Biol. Chem.), essa inibisce la secrezione di anticorpi e, quindi, l'adesione dei macrofagi alle cellule attigue, evento fondamentale per la successiva fagocitosi. La particolarità del controllo di Hpt sui macrofagi è data dall'evidenza che, pur inibendo la fagocitosi macrofagica, essa li stimola a produrre citochine come IL-1 e IL-6. Quest'ultima è responsabile proprio della produzione di Hpt dagli epatociti (Kathy L. et al., Fert. and Ster. 2004). Hpt è capace di regolare anche l'attività dei linfociti T, sopprimendone la proliferazione e inibendo il rilascio di citochine (Arreduani M. et al., Immunol. 2003); tuttavia non è ancora noto quale sia il recettore linfocitario ad essere coinvolto. Una ipotesi è che, indirettamente,

Hpt blocchi il recettore CD 45 (che promuove l'attivazione dei linfociti); interagendo specificamente con CD22, inneschi una serie di reazione a catena, che includono l'attivazione di CD45 e, il conseguenziale funzionamento dei linfociti T (Piva M. et al., J. Soc. Gynecolog. Invest. 2000). Numerose sono le evidenze che attestano che Hpt è una proteina di sintesi extraepatica: essa è stata localizzata in tessuti come intestino, rene, cuore e pelle (Kalmovarian N. et al., Inflamm. 1991).

Non del tutto chiara è l'attività di Hpt sintetizzata dai cheratinociti (KCs) della pelle (Xie Y. et al., J. Dermat. Sci. 2000). Anche in questo distretto, essa sembra essere coinvolta in processi di risposta infiammatoria. Specificamente, non è ancora chiaro se Hpt, prodotta dai cheratinociti, solleciti le cellule dendritiche (o Langherans cells:LCs) alla maturazione o, se essa stessa funga da diretto segnale nell'attivazione dei linfociti T. Ciò che è noto è che le LC presentano dei recettori di riconoscimento per Hpt, che sono CD18 e CD11b sulla loro superficie (El-Ghmati SM. et al., J Immunol 1996). L'ipotesi è che Hpt prodotta dai KCs previene la maturazione delle LCs contribuendo ad un silenziamento della risposta immunologica a livello della pelle (Xie Y. et al., J. Dermat. Sci. 2000).

Hpt è anche coinvolta in processi di migrazione cellulare (de Kleijn DPV. et al., FASEB J. 2002). Infatti, inibendo le *collagenasi*, partecipa ad eventi di rimaneggiamento della matrice per la ricostruzione della parete arteriosa (Mirjam B et al., Int. J. Exp. Phat. 2003). Il *turn-over* del collagene è fondamentale in numerosi processi fisiologici, come crescita e rimarginamento delle ferite.

L'evidenza della presenza, in circolo, di glicoforme di Hpt, differenti dalle forme prodotte dal fegato, in qualche modo potrebbe spiegare come Hpt possa svolgere differenti funzioni. Sembra, infatti, che l'organismo si stia evolvendo verso una sorta di economia di sintesi proteica; invece di produrre nuove proteine, esso sfrutta la sintesi di scheletri di aminoacidici (già destinati a funzioni in circolo) e, rimaneggiandone il codice glicanico li rende competenti a svolgere differenti funzioni. Ciò che rende perplessi è che tali modifiche siano associate ad eventi patologici, come crescita o morte incontrollata di tessuti. Non è del tutto chiaro, infatti, se la differente attività delle glicosietrasferasi, che determina le variazioni glicaniche, sia

sotto controllo genico di processi regolati per contrastare questi eventi incontrollati, o se siano essi stessi l'espressione di un organismo in difficoltà.

1.2b Variazioni glicaniche di Hpt

Hpt è una proteina le cui catene glicaniche sono spesso modificate in seguito all'insorgenza di patologie. Le prime analisi condotte sulle variazioni glicaniche di Hpt sono state associate esclusivamente a disturbi epatici, essendo il fegato il maggiore produttore di tale proteina. In seguito a cirrosi epatica, causata da abuso di alcolici, è stato ritrovato, in circolo, un incremento di forme di Hpt fucosilate (Mann AC. et al., Clin. Chem. Acta 1994). Successivamente, la glicosilazione di Hpt è stata presa in considerazione anche in altre patologie, che non riguardavano il fegato, come l'endometriosi. Tali analisi si basavano sull'evidenza che, in seguito a lesioni all'endometrio, la concentrazione di Hpt in circolo aumentava. Solo successivamente è stato accertato che essa blocca la fagocitosi macrofagica e stimola questi ultimi a produrre IL-6. Tale funzione è stata considerata come controllo della produzione di Hpt in quanto IL-6 è il maggiore stimolatore delle cellule epatiche a produrre Hpt stessa (Piva M. et al., Mol. Hum. Rep. 1999). Si notò, inoltre, che i macrofagi, prelevati dall'endometrio delle donne affette dalla patologia, avevano una maggiore capacità di legare Hpt (Kathy L. et al., Fert. and Ster. 2004) e che Hpt interagiva con lo specifico recettore macrofagico CD18a (Turner GA. et al., Glycoconj. J. 1995). Le analisi, condotte per comprendere la ragione di tale differenza di affinità, fecero notare che la glicosilazione di Hpt aveva subito delle modifiche in seguito alla patologia. Si ritrovavano, in circolo, maggiori forme fucosilate di Hpt e un gran numero di glicoforme con acido sialico legato "α 2-3", rispetto a quella epatica e presente in condizioni fisiologiche (Piva M. et al., Glyconj. J. 2002). Successivamente si notò che esiste un rapporto preciso tra le forme con acido sialico "α 2-6" e quelle con acido sialico "α 2-3" e che la glicoforma maggiormente espressa, in condizioni fisiologiche, è la prima. Oggi è noto che le catene glicaniche con

acido sialico “ α 2-3” sono caratteristiche di ramificazioni tri-antennarie (Piva M. et al., *Glycoconj. J.* 2002), dato che l’enzima *α (2-3)-sialyltransferase* necessita, come substrato, di forme maggiormente ramificate. In tale patologia, Hpt risultava essere elettroforeticamente più leggera di circa 3kDa rispetto a quella del siero. Questa differenza fece presupporre ad una minore glicosilazione di Hpt come nel caso della *carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome* (Ferens-S. et al., *Glycoconj. J.* 1999); in questa patologia, infatti, è stata riscontrata una minore glicosilazione della proteina. In dettaglio, solo il 50% della proteina presente nel circolo di pazienti con endometriosi è risultata essere interamente glicosilata, mentre il 30% presentava 3 Asn occupate e il restante 20% presentava solo 2 catene glicaniche, su quattro possibili siti di N-glicosilazione. Le catene glicaniche non sono risultate essere, invece, differenti per quanto riguarda la loro composizione (Ferens-S. et al., *Glycoconj. J.* 1999).

Glicoforme analoghe di Hpt sono state ritrovate anche in pazienti affetti da ipotiroidismo. In questo caso, però, il trattamento terapeutico con l’ormone tiroideo T₄ determina un ripristino della corretta glicosilazione della proteina (Yong PH. et al., *Clin. Biochem.* 2006). Per quanto tali analisi strutturali siano numerose, esse non sono corredate da altrettanti analisi funzionali e quindi non è ancora chiaro in che modo la glicosilazione della proteina determini anche un diverso funzionamento della stessa. Un caso in cui la variazione glicanica ha determinato una variazione funzionale della proteina è nell’insorgenza dell’infarto al miocardio. È stato riportato che Hpt, prodotta dai fibroblasti della parete arteriosa, partecipa alla riformazione della stessa, dopo interventi di stress meccanico come quello della *balloon dilation* (Mirjam B. et al., *Card. Resh.* 2003). Tale funzione è stata attribuita alla fucosilazione della catena glicanica che, probabilmente, rende la proteina capace di regolare il turn-over della matrice extraplasmatica e la migrazione cellulare (Mirjam B. et al., *Int. J. Exp. Path.* 2003).

Più recenti, invece, sono le analisi condotte su Hpt in artrite reumatoide, in cui, anche se appare ancora controversa l’analisi sulla complessità delle ramificazioni glicaniche, è chiaro che si ritrovano in circolo maggiori glicoforme fucosilate (Sunil KR. et al., *Glycoconj. J.* 2006;).

In caso di cancro pancreatico, addirittura, la fucosilazione di Hpt è stata proposta come marcatore della patologia, visto che essa scompare dopo intervento chirurgico (Okuyama N. et al., *Int. J. of Cancer* 2007). Infine, mediante analisi condotte su pazienti affetti da cancro prostatico, è stato dimostrato non solo che c'è un incremento di fucosilazione a carico della catena glicanica ma anche una precisa distribuzione delle catene sui diversi residui di asparagina. In dettaglio, è stato riportato che, benché le forme maggiormente rappresentate in questa patologia siano catene bi-antennarie, sono presenti anche catene tri-antennarie e tetra-antennarie, specificamente localizzate su Asn48 e Asn50. In queste posizioni sono state ritrovate anche forme di Hpt con glicano sLe^x, mentre su Asn23 si sono ritrovate solo forme biantennarie e su Asn80 esclusivamente forme triantennarie. Le catene maggiormente ramificate non appaiono, inoltre, completamente sialate, ma complessate come forme mono- e disialate. Addirittura, sono stati riscontrati piccoli casi di O-glicosilazione (Fujimura T. et al., *Int. J. of Cancer* 2008), ma, su quest'ultima affermazione, gli stessi autori hanno indicato l'esigenza di effettuare ulteriori esperimenti.

È sulla base di quanto riportato in letteratura che prende spunto questo lavoro di tesi sperimentale. Partendo dall'evidenza che Hpt, sintetizzata dai cheratinociti della pelle (come accennato precedentemente) partecipa in eventi di attivazione delle DCs, migrazione cellulare, processi angiogenetici e rimarginamento delle ferite, in questo lavoro di tesi sperimentale si è voluto indagare sul suo possibile coinvolgimento nell'insorgenza e progressione della psoriasi. In dettaglio, è stato analizzato se alla patologia fossero associate variazioni strutturali dei glicani di Hpt.

1.3a Pelle come sistema immunitario

La pelle, o cute, è un organo di rivestimento costituito da uno strato superficiale, l'epidermide, ed uno strato sottostante, il derma.

Le cellule dell'epidermide più rappresentate sono i cheratinociti; tuttavia, sono presenti altri tipi cellulari, come le cellule di Langerhans, i linfociti, le cellule di Merkel e i melanociti. I cheratinociti sono cellule in attivo

differenziamento e, in base alle loro caratteristiche, l'epidermide stessa è suddivisa in: strato basale, strato spinoso, strato granuloso e strato corneo. Il derma invece, differenziato in derma lasso e derma denso, è essenzialmente composto da macrofagi, fibre di collagene, fibroblasti e mastociti, nonché da nervi sensoriali e vasi sanguigni.

La cute, inoltre, essendo un elemento di confine tra l'ambiente interno e quello esterno, è un organo complesso, con importanti funzioni difensive. Essa, infatti, non solo rappresenta una barriera fisica, difficile da superare per virus e batteri, ma è anche in grado di neutralizzare l'attività di microrganismi patogeni con difese chimiche. Le prime indagini, a tale proposito, risalgono agli anni '60 quando, analizzando la cute lesa di un paziente affetto da *Lupus erythematosus*, furono evidenziati depositi di immunoglobuline e cellule del sistema immunitario che, interagendo tra loro e con le cellule attigue, innescavano la risposta immunitaria.

Il compito principale del sistema immunitario è di proteggere l'organismo dalle sostanze dannose, sia endogene che esogene; tale compito è reso possibile dall'attivazione di cellule specializzate nella presentazione dell'antigene (cellule di Langerhans), sottopopolazioni di linfociti T (che circolano preferenzialmente nei linfonodi periferici e nella cute con una specifica affinità per l'epidermide) e cheratinociti in grado di secernere una grande varietà di sostanze ad azione immuno-regolatrice.

Un tipico processo di risposta immunitaria cutanea prevede, come evento introduttivo, l'attivazione delle cellule di Langerhans, che sono cellule dendritiche d'origine midollare, localizzate nello strato soprabasale dell'epidermide o più in profondità (cioè nel derma). Il loro compito è quello di riconoscere l'antigene, trasportarlo a livello del linfonodo secondario e stimolare le cellule T vergini. Le cellule di Langerhans dunque fungono da cellule bersaglio necessarie per l'attivazione dei linfociti T. In particolare, quando un antigene che penetra attraverso la cute incontra le cellule di Langerhans, che lo catturano e lo endocitano all'interno di vescicole; qui, una parte dell'elemento patogeno viene degradata, mentre un'altra piccola porzione viene esposta in superficie, legata a recettori MHC di classe II. L'unità recettore-patogeno destinata ad inserirsi a livello della

membrana della LC innesca una risposta locale (autocrina) con produzione di citochine pro-infiammatorie.

Queste ultime interagiscono con recettori delle LC che, così stimolate, perdono la loro naturale adesività per le cellule dell'epidermide, assumono una forma rotondeggiante e migrano raggiungendo i vasi linfatici presenti nel derma. In questa sede, da cellule capaci di processare l'antigene, esse diventano potenti APC (antigens processing and presenting cells) capaci di attivare i linfociti T, dando così inizio ad una risposta immunitaria specifica. Esistono due tipi di linfociti T: i linfociti T Killer e i linfociti T helper; tuttavia, sono questi ultimi ad essere attivati specificamente dalle cellule dendritiche. Le cellule T helper, così attivate, maturano e producono una serie di citochine non solo con la funzione di attivare le cellule attigue (come linfociti B, linfociti T killer e macrofagi), ma anche ad attività autocrina (capace, cioè, di attivare la proliferazione dei linfociti T stessi). Talvolta, questo sistema, finemente regolato ed estremamente importante per l'individuo, cessa di funzionare correttamente e si rivolta contro il sé, causando una serie di malattie autoimmuni. Un esempio, in tal senso, è dato dalla *Psoriasi* che è una malattia infiammatoria, che si manifesta a livello della pelle mediante rigonfiamento e formazione di placche scagliose.

1.3 b Psoriasi

La psoriasi è una malattia infiammatoria, di carattere cronico e recidivante, che si manifesta generalmente a livello del derma e dell'epidermide. Tale patologia può presentarsi sotto varie forme; tuttavia, la più comune, *Psoriasis vulgaris* (detta anche Psoriasi a placche), è caratterizzata dalla presenza di un ispessimento scaglioso di colore bianco-argento che può rivestire la superficie cutanea anche interamente. Le regioni corporee maggiormente colpite sono lo scalpo, le braccia (in particolare i gomiti), le gambe e la superficie palmo-plantare. Inoltre, data la bassa qualità della vita, legata sia all'influsso negativo di tale patologia con il normale svolgimento delle attività quotidiane sia ai costi di assistenza e terapia, essa ha notevoli ripercussioni sullo stato mentale dei pazienti.

Approssimativamente il 2-3% della popolazione mondiale è affetta da psoriasi che, nel 30% dei casi, degenera in artrite psoriasica, patologia simile all'artrite reumatoide. È noto, infatti, che la manifestazione cutanea della patologia può precedere la forma che interessa le articolazioni determinando la malformazione degli arti e la perdita dell'uso degli stessi. L'intervento terapeutico, dunque, ha come fine non solo il rimarginamento delle lesioni cutanee, ma anche la prevenzione nell'insorgenza di patologie associate alla psoriasi.

L'eziologia della psoriasi è ancora sconosciuta, tuttavia i dati attualmente a disposizione, sembrano indicarne un'origine poli fattoriale. Si riconosce, infatti, un'influenza ambientale, determinata da vari tipi di infezioni, dermatiti da contatto, la brusca deplezione di corticosteroidi sistemici, l'aumento di specifiche citochine (interferone α - β - γ , IL2, G-CSF) ed alcuni trattamenti terapeutici come α -bloccanti, ACE inibitori ed antimalarici, quanto un' influenza di tipo genetico. Nella placca psoriasica sono stati identificati ben oltre 1000 geni coinvolti nella insorgenza quanto nella progressione della patogenesi molti dei quali codificano per proteine di cellule dendritiche e linfociti T, molecole di adesione, citochine e fattori di regolazione della trascrizione (Gottlieb AB., Nature 2005). Il coinvolgimento genico è, inoltre, avvalorato dall'evidenza che la psoriasi è una malattia di tipo ereditario; infatti, il 36% dei pazienti che manifesta lesioni cutanee ad un'età statisticamente inferiore alla media, ha uno o più parenti affetti da psoriasi.

L'influenza della genetica, inoltre, rappresenta il motivo per cui, allo stato attuale delle conoscenze, la guarigione è comunemente ritenuta improbabile: quindi, l'obbiettivo di ogni tipo emergente di strategia terapeutica è il raggiungimento e mantenimento di condizioni con bassa sintomologia, ovvero definire protocolli clinici per ottenere e reiterare una remissione (transitoria) della malattia associata ad una migliore qualità della vita.

1.3c Psoriasi: meccanismi molecolari

La psoriasi è causata sostanzialmente dall'instaurarsi di un circolo vizioso dovuto all'interazione tra due tipi cellulari: i cheratinociti ed i linfociti. Se questi ultimi rappresentano infatti gli effettori della risposta autoimmune, il loro reclutamento ed il mantenimento della loro presenza, nel sito cutaneo interessato, è dovuto alla produzione, da parte dei cheratinociti, di citochine. Queste ultime sono molecole in grado non solo di innescare ma anche di prolungare nel tempo la risposta immunitaria. Una volta innescata la risposta immunitaria, alcune classi di globuli bianchi, richiamati nel sito cutaneo interessato, producono, a loro volta, citochine in grado di stimolare sia l'attivazione dei linfociti T che l'attivazione degli stessi cheratinociti, generando un sistema patologico autoalimentato. Ne risulta un'inflammatione cutanea localizzata, in cui i linfociti T attivati svolgono un ruolo distruttivo nei confronti del tessuto che attiva sistemi di rigenerazione rapida pur non essendo presente nessun tipo di lesione cutanea.

La somma di tutti questi fattori determina l'instaurarsi del fenotipo finale. In dettaglio, i cheratinociti attivano, da un lato il sistema immunitario innato, composto da neutrofili e cellule dendritiche, dall'altro il sistema immunitario adattativo mediante il reclutamento dei linfociti T e cellule "natural killer". Le cellule dendritiche producono a loro volta alcune citochine, come l'interferone alfa (IFN- α), l'interleuchina 23 (IL-23), il tumor necrosis factor (TNF- α), mentre i linfociti T e le natural killer producono interferone gamma (IFN- γ) e TNF α . Tutte queste citochine svolgono diversi ruoli nel sito infiammatorio: alcune stimolano i cheratinociti, altre richiamano ulteriori linfociti, altre ancora stimolano la moltiplicazione clonale dei linfociti già presenti. In effetti il numero di molecole coinvolte nelle vie biochimiche attivate nel sito infiammato è estremamente elevato, e ciò giustifica il fatto che numerosissime alterazioni geniche sono state associate alla psoriasi. Risulta interessante analizzare la precisa sequenza di eventi che scatena questo processo infiammatorio; secondo uno dei modelli sperimentali un insieme di eventi iniziali (tuttora non del tutto noti, pertanto definiti "ambientali", come ad esempio un'infezione batterica o virale)

determinerebbe una prima blanda attivazione delle cellule dendritiche residenti nel tessuto cutaneo (**Fig. 9**). Le dendritiche attivate cominciano a produrre IL-23 che determinerebbe l'attivazione dei linfociti T residenti, i quali comincerebbero a produrre IFN- γ e TNF α . Le cellule DC producono anche IFN- α , IL-20 e TNF- α , citochine in grado di attivare geni che a loro volta stimolano l'attivazione dei cheratinociti; anche l'IFN- γ ed il TNF α prodotti dai linfociti T attivati svolgerebbero la stessa funzione, determinando quindi l'innesco della reazione infiammatoria già descritta sopra. Questo è solo uno dei modelli sperimentali, che tiene conto dei risultati al momento disponibili: tuttavia, sebbene ad oggi poco si conosce circa l'evento molecolare scatenante (se ve n'è uno), molte delle citochine coinvolte in questo processo possono essere concettualmente il bersaglio di una terapia mirata. In effetti, alcune terapie di nuova generazione, che hanno queste citochine come bersaglio, si stanno dimostrando estremamente efficaci nella cura della psoriasi.

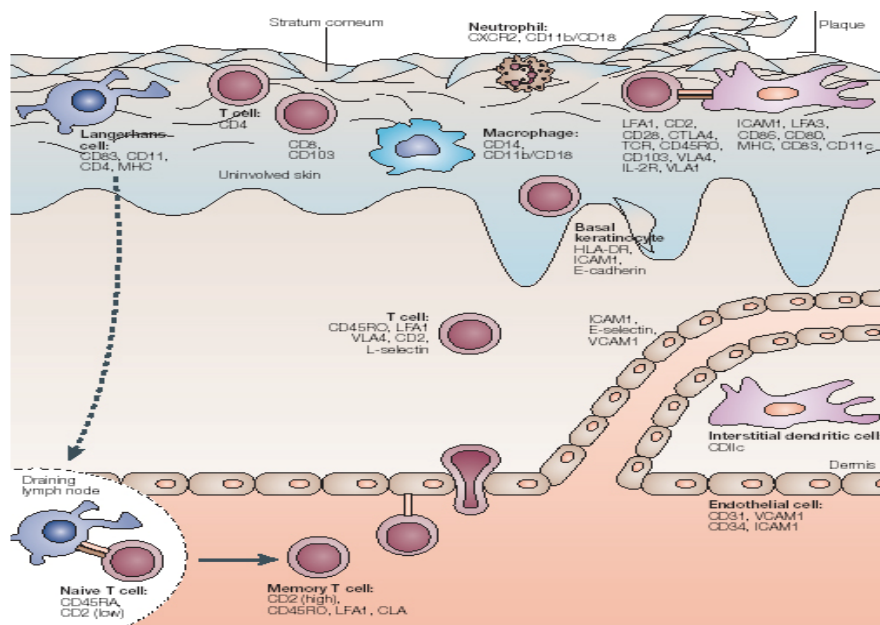


Fig.9 Immunopatogenesi della psoriasi. In figura sono rappresentate alcune delle cellule coinvolte nella patogenesi della psoriasi. Dopo lo stimolo, le DC attivano, attraverso la formazione di immuno-sinapsi, le cellule T. Tale interazione attiva NF κ B e determina il rilascio di citochine, chemichine, proteasi e altri mediatori infiammatori coinvolti in processi di rimarginamento di ferite. La produzione di citochine determina inoltre, l'extravasazione dei linfociti T dai vasi sanguigni e una intensa proliferazione dei cheratinociti nello stato superficiale dell'epidermide.

Per quanto riguarda l'attuale intervento terapeutico per la malattia, ogni evento responsabile della sua espressione è considerato un possibile bersaglio su cui intervenire. Mentre in passato si utilizzavano *veleni* come l'arsenico e l'ammonio di mercurio, oggi vengono utilizzate molecole che fungono da interferenti nella comunicazione tra le cellule. Recentemente, si è aperta la strada all'uso di molecole dette 'biologics', capaci sia di impedire il riconoscimento tra cellula dendritica e cellule T (abatacept, efalizumab ed etanercept) sia di inibire il TNF- α (etanercept, infliximab ed amalimumab). Tuttavia, a causa della forte influenza genetica che predispone gli individui a tale patologia, la guarigione è improbabile; quindi, l'obiettivo di ogni tipo emergente di strategia terapeutica è il raggiungimento ed il mantenimento di condizioni con bassa sintomatologia, ovvero, definire i protocolli clinici per ottenere e reiterare una remissione transitoria della malattia associata ad una migliore qualità di vita.

2.MATERIALI E METODI

2.1a Materiali

Per i saggi ELISA, sono state utilizzate micro piastre da 96 pozzetti (del tipo *easy wash*) della Nunc. Dalla Sigma-Aldrich sono stati acquistati i seguenti prodotti: Hpt umana (pool di fenotipi: Hpt 1-1, Hpt 1-2, Hpt 2-2), albumina di siero umano (BSA), colesterolo, colesterolo linolato, emoglobina (Hb), dicloruro di o-fenilendiammina (OPD), perossido di idrogeno, anticorpi anti-Hpt umana in coniglio (Ab1), anticorpi di capra, contro anticorpi di coniglio, coniugati con per ossidasi di rafano (Ab2), avidina e, marcatori ad alto peso molecolare, PNGasi G glycerol free, il cromoforo 2-ammino benzamide ed il sodiocianoboroidruro. I codici glicanici standard e le unità di glucosio sono state acquistate dalla Ludger. Le colonnine per la purificazione dei codici glicanici sono state acquistate dalla Supelco mentre la colonna HPLC Amide80, utilizzata per l'identificazione degli stessi è stata acquistata dalla Tosoh Corporation. Dalla Calbiochem è stato comprato l'apolipoproteina ApoA-1 e, l'anticorpo anti-ApoA-1 in coniglio. Dalla Perkin Elmer è stato acquistato [1 α , 2 α -³H] colesterolo (45 Ci/mmol). Le colonnine Hi-trap (del tipo "NHS-activated") e resine Sephacryl S-200 sono state acquistate dalla Amersham-Pharmacia. Dalla Millipore sono stati comprati i filtri di nitrocellulosa (0.45 e 0.22 μ m) per filtrare le soluzioni. Materiale monouso, Sali ed altre sostanze chimiche per la preparazione e la manipolazione di reattivi e soluzioni sono state acquistate dalla Delchimica. Infine, dalla EY sono state comprate le lectine (SNA, LTA, MAA e ConA). Il tampone IPG 3-10 e le IPG 4-7 strip sono state acquistate dall'GE Healthcare.

2.1b Donatori e considerazioni cliniche

I plasmi degli individui di controllo (N=44), e dei pazienti psoriasici (N=46) sono stati forniti, rispettivamente, dal centro trasfusionale dell'ospedale

“Pellegrini” di Napoli e dal dipartimento di Patologia Sistemica del Policlinico “FedericoII” di Napoli.

2.2 Metodi

2.2.1 Purificazione di aptoglobina

a) cromatografia di affinità

La resina (NHS- activated Sepharose) delle colonnine Hi-trap ($V_{tot}=1$ mL) è commercializzata in isopropanolo (per preservare nel tempo la stabilità dei gruppi attivi della resina) che deve essere allontanato con 1 mM HCl freddo al momento dell'utilizzo della resina. La caratteristica del gruppo attivo della resina è quella di instaurare un legame di tipo covalente con il terminale $-NH_2$ di qualsiasi proteina. La proteina con cui è stata condizionata la resina della colonna è stata in un caso Hb, (affinità con emoglobina) e in un altro l'anticorpo anti-Hpt in coniglio (affinità con anticorpo) sciolta in soluzione di *coupling* (0.2 M $NaHCO_3$, 1 M NaCl, pH 8.3), a concentrazione compresa tra 1 e 10 mg/mL. Questa soluzione, immessa sulla colonna, è stata incubata a 25°C per 30 min. I gruppi reattivi (che legano le proteine) sono stati disattivati con lavaggi alternati (6 mL) di Tampone A (0.5 M etanolamina, 0.5 M NaCl, pH 8.3) e Tampone B (0.1 M acetato, 0.5 M NaCl, pH 4). Dopo il terzo lavaggio con il Tampone B, sono stati aggiunti 2 ml di tampone fosfato (0.2 M Na_2HPO_3 , 0.2 M NaH_2PO_3 , pH 7) per portare alla neutralità il pH. A questo punto, la colonna, pronta per essere usata per la cromatografia di affinità, è stata equilibrata con 10 volumi di tampone P-Buffer (200 mM Na_2HPO_4 , 200 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4) e caricata con 1 ml di plasma a 0.2 mL/min. Per la purificazione di Hpt, sono state utilizzate tre colonne diverse per ciascun gruppo di studio. Inoltre, i campioni di plasma provenienti dai diversi individui delle due categorie di interesse sono stati caricati, sulla propria colonna, separatamente. L'affluente dalla colonna è stato ricaricato ancora 3 volte, per ottenere il massimo legame di tutte le isoforme di Hpt. Subito dopo, la resina è stata abbondantemente lavata con

PBS a 1ml/min, per rimuovere il materiale non legato. Quando l'assorbanza a 280 nm nell'effluente è risultata ≤ 0.001 OD/mL, è stata effettuata l'eluizione del materiale selezionato con un metodo "di eluizione frazionata" da noi messo a punto. In dettaglio sono state raccolte prima 30 frazioni da 0.5 mL (in tubi contenenti 1 M Tris-base, per riportare il pH a 7.4) eluite con 0.1 M Gly-HCl, pH 3.5, ad una velocità di flusso di 0.8 mL/min. Tale metodica ci consente di eliminare, in prima battuta, eventuali contaminanti legati debolmente alla proteina di interesse. Quando l'assorbanza misurata è stata inferiore a 0.01 OD/mL, Hpt è stata eluita, libera dalla maggior parte di contaminanti, con 0.1 M Gly-HCl, pH 2.8, raccogliendo 20 frazioni da 0.5 ml (in tubi contenenti 1 M Tris-base, per riportare il pH a 7.4); l'assorbanza a 280 nm e 260nm è stata misurata per monitorare l'eluizione della proteina. Le frazioni del picco del cromatogramma sono state analizzate per elettroforesi per valutarne la purezza.

b) salting out delle proteine plasmatiche

Lo scopo di questa prima parte sperimentale è stato quello di isolare Hpt dal plasma liberandola da altre proteine, in modo da ottenere, in prima battuta, una frazione ricca di Hpt. Sono stati fatti due pool plasmi, uno proveniente da plasma di donatori sani (N = 9), ed uno proveniente da plasma di psoriasici (N = 6). Questo metodo si basa sull'aggiunta, al campione proteico, di piccole quantità di ammonio solfato, il sale maggiormente utilizzato perché molto solubile in acqua. L'aggiunta del sale rimuove il sottile strato di molecole di acqua dalla superficie della proteina, permettendo ai gruppi idrofobici di causare l'aggregazione delle proteine che così precipitano (da Metodologia Biochimica, Keith Wilson e John Walzer). Abbiamo effettuato precipitazioni a due diverse percentuali di ammonio solfato: 0-35%, 35%-55%. Il sale è stato aggiunto al plasma in agitazione e, successivamente, centrifugato a 20000 rpm, 3 volte, per 15 minuti circa. Dopo il primo ciclo di centrifugazioni, è stato recuperato il surnatante, che contiene proteine non ancora precipitate, e sono stati aggiunti ulteriori granelli di sale in modo da raggiungere in soluzione una concentrazione di solfato d'ammonio pari al 55%. Sono stati ripetuti quindi

i cicli di centrifugazione, è stato recuperato il surnatante e risospeso il pellet in TBS (20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 7.4). I pellet, una volta risospesi e opportunamente diluiti, sono stati sottoposti ad un' elettroforesi in condizioni denaturanti e riducenti al fine di valutare quale fosse il taglio di ammonio solfato a cui precipitava la gran parte di Hpt. Poi, il pellet recuperato con la precipitazione, taglio di ammonio solfato al 35-55%, è stato sciolto in TBS e centrifugato a 14000 rpm per 5 minuti. Dopo aver centrifugato, il campione è stato caricato su una colonna cromatografica Sephacryl S-200.

b) Gel filtrazione

La gel filtrazione è un tipo di cromatografia ad esclusione e permette la separazione di molecole differenti sulla base delle loro dimensioni e della loro forma. I materiali più utilizzati sono dei composti organici polimerici che possiedono una rete tridimensionale di pori che conferisce loro le proprietà di un gel. La resina utilizzata per tale separazione è una Sephacryl S-200 che ha un intervallo di separazione di $5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^5$ Da. La colonna è stata impacchettata con acqua, poi è stata dapprima sterilizzata con 0.1 M NaOH, e successivamente equilibrata con 10 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl a pH 7.3. La velocità di flusso di carica e recupero del materiale dalla colonna è stato mantenuto costante ad una velocità di 10 mL/h. Dopo la carica del campione (2.5 ml), sono stati dapprima raccolti 35 ml di tampone che rappresenta il volume di esclusione dalla colonna. La successiva eluizione ha permesso di raccogliere 158 frazioni da 1.5 ml ciascuna, per un volume totale di 237 ml. Tale procedura è stata eseguita anche per i plasmi di pazienti affetti da psoriasi. Tuttavia, siccome si è partiti da una minore quantità di plasma, è stata utilizzata una colonna S-200 da 40 mL su cui sono stati caricati 0.8 mL di campione. Avendo escluso il V_0 della colonna (13mL), sono state raccolte 40 frazioni da 1 mL. Terminata la raccolta delle frazioni, in entrambi i casi, è stata misurata l'assorbanza a 280 nm e 260 nm, per monitorare la ripartizione del materiale proteico in colonna. Le frazioni corrispondenti ai picchi a 280 nm sono state caricate su un gel di poliacrilammide al 15% per l' analisi elettroforetica

delle proteine in esse contenute. Lo scopo della suddetta gel filtrazione è quello di allontanare non solo ammonio solfato dal campione, ma anche eventuali contaminanti proteici da Hpt, come l' albumina, che eluisce dopo il picco di eluizione di Hpt. Successivamente è stato fatto il pool delle frazioni contenenti Hpt (da 31 a 41) e la miscela è stata sottoposta alla cromatografia d'affinità con anticorpo.

2.2.2 Elettroforesi

a) SDS-PAGE in condizioni denaturanti e riducenti

L' elettroforesi, in condizioni riducenti e denaturanti (SDS-PAGE), è stata eseguita su gel discontinuo, sostanzialmente in accordo al metodo di Laemmli (1970). Per preparare il gel, è stata utilizzata una soluzione madre di acrilamide e bis-acrilammide (N,N'-metilene-bis-acrilammide), rispettivamente al 30% ed allo 0.8%. Il gel di separazione era costituito da una soluzione di poliacrilammide al 15% contenente 300 mM Tris-HCl a pH 8.8 e 0.1 % SDS; uno strato superiore di gel era costituito da una soluzione di poliacrilammide al 6%, contenente 137 mM Tris-HCl a pH 6.8 e 0.1% SDS. Per la polimerizzazione, sono stati utilizzati, come catalizzatori, persolfato di ammonio e TEMED (N,N,N',N'-tetrametil, etilendiammina), secondo una procedura pubblicata (Laemmli UK. et al., Nature 1970). Le dimensioni del gel di separazione erano: 8 cm (altezza) x 6.5 cm (larghezza) x 0.15 cm (spessore). Il tampone di corsa (a pH 8.3) è stato preparato sciogliendo 14.4 g di glicina e 3 g di Tris in un litro di acqua bi distillata, a cui sono stati aggiunti 10 ml di 10% SDS. I campioni, contenenti 3-5 µg di proteina totali sospesi in un tampone riducente e denaturante (62.3 mM Tris-HCl a pH 8.6, 10% di glicerolo, 5% β-mercaptoetanol, 0.3% blu di bromo fenolo, 5% SDS) (O'Farrell, J. Biol. Chem.1975), sono stati incubati a 100°C per 5 min e, poi, caricati sul gel. Per stimare la migrazione elettroforetica delle proteine sono stati utilizzati marcatori ad alto peso molecolare (BSA, 66KDa; albumina d'uovo, 45KDa; gliceraldeide-3-fosfodeidrogenasi, 36 KDa; anidrasi carbonica 29KDa;

tripsinogeno, 24 KDa; inibitore della tripsina 20 KDa; e, α -lactalbmina 14 KDa). L' elettroforesi, effettuata a 30 mA per 120 min, è stata bloccata 20 min dopo che il colorante ha raggiunto l'estremità inferiore del gel.

b) SDS-PAGE in condizione denaturanti e non riducenti

Per separare le isoforme di Hpt è stata eseguita un'elettroforesi in condizioni denaturanti ma non riducenti con un gel di poliacrimammide al 6%. In particolare, il campione di Hpt purificata (3 – 5 μ g) è stato incubato per 5 minuti a 37 °C in O'Farrell preparato senza β -mercaptoetanolo e, caricato sul gel. La corsa elettroforetica è stata condotta per 2 ore a 100 V. Dopo l' elettroforesi, il gel è stato fissato con acido acetico-isopropanolo-acqua (10-25-65, v/v/v) e colorato con Coomassie R-250. Infine, per eliminare il Coomassie che non si è legato alle proteine del gel sono stati eseguiti ripetuti sciacqui con acido acetico al 10%.

c) 2D-Elettroforesi

L'elettroforesi bidimensionale è stata effettuata in accordo alla procedura Goerg (Goerg et al.,2004). In dettaglio, a 6 μ l di plasma (contenente circa 400 μ g di proteine totali) sono stati aggiunti 10 μ l di acqua contenente 5%SDS (w/v), 2,5%DTT (w/v) e bolliti per 5min a 95°. Il materiale proteico è stato ulteriormente diluito con 330 μ l di una soluzione contenente 7M urea, 2M tiourea, 4% CHAPS (w/v), 0,5% IPG tampone 3-10 NL (v/v) e tracce di blu di bromofenolo (Huges GJ. et al., Electrophoresis 1992). Il campione è stato poi caricato su IPG 4-7 strip (di 18 cm) mediante la fase di reidratazione inizialmente eseguita passivamente (2h a 0V) e poi mediante applicazione di corrente (12 h a 30 V). L'elettrofocalizzazione è stata poi eseguita a 20°C come segue:500 V ad una corrente di 500Vh, 1,000V a 1,00 Vh (con un gradiente lineare), 8,000 V a 13,500 Vh (con un gradiente lineare di corrente), 8,000V a 72,000 Vh. Attraverso tale fase le proteine si distribuiscono, sullo strato sottile gelatinoso che ricopre le strip, in base al loro pI. Dopo tale fase, le strip e, quindi, il materiale ad esse ancorato, vengono sottoposte a reazione di riduzione e alchilazione. In dettaglio sono

lasciate per 15min in una soluzione contenente 50mM Tris-HCl 8,8, 6M urea, 30% glicerolo (v/v), 2% SDS (w/v), 1% ditiotreitolo (DTT) e tracce di blu di bromofenolo. Successivamente le strip sono equilibrate per 15 min nel medesimo tampone contenente al posto del DDT (utilizzato per la riduzione dei gruppi SH₂ delle cisteine) 2,5% iodacetammide (per la successiva alchilazione). Essendo la iodacetammide sensibile alla luce il passaggio è stato eseguito al buio. Segue quindi la separazione delle proteine in seconda dimensione (in cui le proteine sono discriminate in base al loro peso molecolare) mediante SDS-PAGE.

2.2.3 Densitometria quantitativa

I gel, ottenuti come sopra descritto, sono stati fotografati, digitalizzati ed analizzati mediante il software Gel-Pro (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA). L' intensità delle bande è stata espressa sotto forma di picchi su un densitogramma. Le aree dei picchi sono state misurate ed espresse, arbitrariamente, come *Integrated Optical Density* (IOD). Successivamente, si è proceduto alla calibrazione degli IOD delle bande ottenute utilizzando quantità note di BSA. In pratica, è stato determinato che 1 IOD corrisponde a 5 ng di proteina colorata con Coomassie R-250. I gel 2D-E sono stati acquisiti mediante un ImageMaster Labscan V3.0 (GE Healthcare) a 600 pixel/inch in formato TIF e analizzati mediante un software d'immagine ImageMaster 2D Platinum software (GE Healthcare) per l'analisi densitometrica. La densità ottica rilevata dall'apparecchio, per ogni singolo spot, è stata espressa come % della densità ottica di tutti gli spot corrispondenti alle isoforme della subunità β di Hpt.

2.2.4 Procedura ELISA

a) Titolazione di Hpt

Hpt purificata dal plasma dei due gruppi di osservazione, con entrambe le metodiche descritte nel paragrafo 2.2.1 di questo capitolo, è stata diluita in tampone di coating (7.3 nM Na₂CO₃, 17 mM NaHCO₃, 1.5 mM NaN₃, pH 9.6) per preparare diverse diluizioni: 1:2000, 1:3000, 1:6000, 1:10000, 1:20000, 1:50000. Contemporaneamente, è stata preparata una retta di taratura con soluzioni note di Hpt standard. In particolare, sono state utilizzate sette diluizioni a concentrazione crescente. Aliquote di ciascuna diluizione sono state deposte nei pozzetti della micro piastra, successivamente incubata per tutta la notte a 4°C: durante questa fase il campione interagisce con il pozzetto di plastica, formando legami stabili, in modo proporzionale alla sua concentrazione (fase di *coating*). Dopo l' incubazione, le piastre sono state lavate tre volte con il tampone EWB (20 mM Tris-HCl a pH 7.3, 130 mM NaCl, 0.05% Tween-20) e tre volte con il tampone TBS (20 mM Tris-HCl a pH 7.3, 500 mM NaCl). In seguito, è stata saturata la capacità legante della plastica (fase di *blocking*) con un tampone contenente BSA (20 mM Tris-HCl a pH 7.3, 130 mM NaCl, 0.5% BSA), incubando per 1 ora a 37 °C; dopo il *blocking*, le piastre sono state lavate come precedentemente descritto. A questo punto, si è proceduto all' incubazione con 60 µl per pozzetto di anticorpo primario (anti-Hpt di coniglio) diluito 1:2000 in DB (0.025% BSA in EWB). L' incubazione è stata effettuata a 37 °C per 1 ora. E' stato ripetuto il lavaggio delle piastre e, poi, si è proceduto all' incubazione dei pozzetti con 70 µl di anticorpo secondario (anti-rabbit IgG coniugato all'enzima perossidasi, diluito 1:5000 nel tampone DB. Anche in questo caso, l' incubazione è stata di 1 ora. Dopo il lavaggio delle piastre, sono stati aggiunti 100 µl di substrato di sviluppo per la perossidasi (20 mg di o-fenilendiammina, e 120 µl di H₂O₂ 3% in 50 ml di una soluzione costituita da 30 mM di acido acetico e 75 mM NaHPO₄). Dopo 20 minuti di incubazione a 37 °C sono stati aggiunti, ad ogni pozzetto, 50 µl di 2.5 M di H₂SO₄, per bloccare la reazione. In seguito all' incubazione con il substrato si è sviluppato un colore in misura

proporzionale alla concentrazione dell'enzima legato all'anticorpo secondario (rispecchiando la concentrazione degli immunocomplessi formati tra anticorpo primario ed antigene) La misura spettrofotometrica dell'assorbanza a 492 nm ha permesso, quindi, di determinare, indirettamente, la quantità di antigene presente nel pozzetto mediante l'uso della retta di taratura per la quale ad ogni valore di assorbanza è possibile associare un valore di concentrazione di Hpt noto.

b)Valutazione del legame di Hpt a proteine (ApoAI, ed emoglobina)

Soluzioni pure (50 µl) di apoAI HSA ed emoglobina, sciolti in tampone di coating (7.3 mM Na₂HCO₃, 1.5 mM NaN₃, pH 9.6) ad una concentrazione di 6.6 ng/µl sono state deposte nei pozzetti della micro piastra ELISA, e successivamente incubate per tutta la notte a 4 °C: durante questa fase, il campione interagisce con il pozzetto di plastica, formando legami stabili, in modo proporzionale alla sua concentrazione (fase di *coating*). Dopo l'incubazione, le piastre sono state lavate tre volte con tampone EWB (20 mM Tris-HCl a pH 7.3, 130 mM NaCl, 0.05% tween-20) e, altre volte con il tampone TBS (20 mM Tris-HCl a pH 7.3, 500mM NaCl). Successivamente, è stata saturata la capacità legante della plastica (fase di *blocking*) con un tampone contenente BSA (20mM Tris-HCl a pH 7.3, 130 mM NaCl, 0.5% BSA), incubando per 1 ora a 37 °C; dopo il *blocking*, le piastre sono state lavate come precedentemente descritto. A questo punto si è proceduto alla fase di *binding*; in particolare sono state utilizzate diluizioni a concentrazione crescente di Hpt (da 0,6 a 62 µg/mL). Aliquote di ciascuna diluizione (50 µl) sono state deposte nei pozzetti della micro piastra che, in seguito, è stata incubata per 1,30h a 37 °C. Al termine dell'incubazione sono stati immessi 60 µL di anticorpo primario per pozzetto (anti-Hpt prodotto in coniglio, diluito 1:8000 in 0.025% BSA in EWB). L'incubazione è stata effettuata a 37° C per 1h. E' stato, quindi, ripetuto il lavaggio delle piastre e, poi, si è proceduto all'incubazione dei pozzetti con 70 µl di anticorpo secondario (anti-coniglio coniugato all'enzima per ossidasi, diluito 1:12000 nel tampone DB: 0.25% BSA in EWB). Anche in questo caso l'incubazione è stata di 1 ora a 37 °C.

Dopo il lavaggio delle piastre sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 100 μ l di substrato di sviluppo per la perossidasi (20 mg di o-fenilendiammina, e 120 μ l di H₂O₂ al 3%, in 50 mL di una soluzione costituita da 30 mM acido citrico e 75 mM NaHPO₄ a pH 5). Dopo 1 ora di incubazione a 37 °C, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 50 μ l di 2.5 M H₂SO₄, per bloccare la reazione. In seguito all'incubazione con il substrato, si è sviluppato colore in misura proporzionale alla concentrazione di enzima (legato all' anticorpo secondario), rispecchiando la concentrazione degli immunocomplessi formati tra anticorpo primario e antigene: la misura spettrofotometrica dell'assorbanza a 492 nm ha permesso, quindi, di determinare indirettamente la quantità di antigene presente nel pozzetto.

b) Valutazione del legame di Hpt a lectine

Hpt purificata da plasma di donatori sani di controllo e da plasma di psoriasici e isolata dalla cute della lesione psoriasica è diluita in tampone di *coating* (7,3 mM Na₂CO₃, 17 mM NaHCO₃, 1,5 mM NaN₃, pH 9,6) e piastra in pozzetti ELISA. La concentrazione di Hpt, depositata nei pozzetti, varia in base al tipo di lectina utilizzata per il saggio. Per testare la reattività alla lectina LTA, che riconosce i residui di fucosio ancorati alla catena glicanica (indipendentemente dalla posizione e dal tipo di legame che lo zucchero instaura con la NAcGlc), sono state utilizzate concentrazioni di Hpt pari a 100 e 200 ng/50 μ l. Per testare la reattività alle lectine ConA e SNA, invece, sono state piastrate concentrazioni di Hpt pari a 25 e 50 ng/50 μ l diluite anche in questo caso in tampone di *coating*. Tali lectine, riconoscono, nel primo caso mannosio e, nel secondo, acido sialico legato mediante legame glicosidico “ α 2-6” al galattosio che lo precede. Infine per testare la reattività alla lectina MAA, che riconosce l'acido sialico terminale delle catene glicaniche, legato in “ α 2-3” al galattosio, sono state piastrate concentrazioni di Hpt pari a 20 e 40 ng/50 μ l. Le piastre così preparate sono state incubate per 2h a temperatura ambiente. Dopo l'incubazione, e gli sciacqui in EWB e TBS, come descritto in precedenza, segue la fase di *blocking*. In questo caso è utilizzato un tampone privo di materiale proteico, onde evitare ogni tipo di interazione aspecifica con le lectine da utilizzare

successivamente. La capacità legante della piastra è, quindi, saturata sottoponendola ad una incubazione per 1h a 37 °C con una soluzione contenente 130 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,3 e 2% Tween 20. Le piastre sono state sottoposte a dei cicli di lavaggio e incubate con 50µl di 1µM lectina biotinilata (ognuna delle quali diluita in una soluzione contenente 130 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,3, 0,05 % Tween 20, 1mM CaCl₂ e 1 mM MgCl₂). Segue una incubazione a 4 °C per tutta la notte. Il giorno successivo le piastre, incubate con le differenti lectine, sono state lavate con EWB e TBS e incubate con 50 µl di avidina perossidasi (1:12000 nel tampone 130 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,3, 0,05 % Tween 20, 1mM). In questo caso l'incubazione è stata di 1 ora a 37 °C. Dopo il lavaggio delle piastre sono stati aggiunti, ad ogni pozzetto, 100 µl di substrato di sviluppo per la perossidasi (20 mg di o-fenilendiammina, e 120 µl di H₂O₂ al 3%, in 50 mL di una soluzione costituita da 30 mM acido citrico e 75 mM NaHPO₄ a pH 5). Dopo 1 ora di incubazione a 37 °C, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 50 µl di 2.5 M H₂SO₄, per bloccare la reazione. In seguito all'incubazione con il substrato, si è sviluppato colore in misura proporzionale alla concentrazione di enzima (legato all'avidina), rispecchiando la concentrazione degli complessi formati tra lectina e carboidrato della catena glicanica: la misura spettrofotometrica dell'assorbanza a 492 nm ha permesso, quindi, di paragonare le differenti reattività alle lectine utilizzate delle catene glicaniche montate su Hpt purificata da plasma di donatori sani, plasma di donatori psoriasici e dall'estratto proteico delle lesioni cutanee psoriasiche.

2.2.5 Preparazione del proteo liposoma

La preparazione del proteo liposoma (Albers et al., 1982; Sparks et al., 1992) è stata effettuata aggiungendo, in un tubo di vetro da 15 ml, 8 µl di fosfatidilcolina (50mg/ml), 18 µl di una soluzione etanolica di colesterolo (1mg/ml). La miscela risultante è stata portata a secco, sotto flusso di azoto, a temperatura ambiente. A questo punto, sono stati aggiunti, nel tubo, 200 µl di tris salino (10mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) e 60 µl di una soluzione

725 mM di sodio colato in tris salino. La dispersione è stata agitata, vigorosamente, per 3 minuti e, incubata a 37 °C per 1 ora e mezzo. Anche durante l'incubazione, la miscela è stata vigorosamente agitata (ogni 10 minuti), affinché diventasse completamente chiara. Al termine dell'incubazione, sono stati aggiunti alla miscela 245 µl di ApoA-1 ed è stata effettuata una seconda incubazione di 1 ora a 37 °C. Infine, la miscela è stata estensivamente dializzata in PBS per 20 ore a 4 °C per rimuovere il colato. In questo modo, è stato ottenuto un tipico proteo liposoma (ApoA-1: lecitina: colesterolo; in rapporto molare 1:5:200:18).

2.2.6 Saggio LCAT

Un pool di plasmi dei campioni, trattato con 0.65% di DS (MW, 50KDa) in 0.2 M di CaCl₂ per rimuovere la VLDL, LDL e HDL, è stato usato come fonte di LCAT. L'attività dell'enzima è stata misurata utilizzando, come substrato, il proteo liposoma preparato come è descritto nel paragrafo precedente. La miscela di reazione (volume finale, 1ml) è stata preparata mettendo, in un tubo, 697 µl di TBE contenente 5 mM CaCl₂, 83 µl di HSA al 6% e, 160 µl di proteo liposoma diluito 1:20 in TBS e, incubando a 38 °C per 30 minuti. In seguito, alla miscela di reazione, sono stati aggiunti 2.5 µl di β-mercaptoetanolo 2 mM e, 4 µl di plasma trattato con DS. Questa miscela è stata, poi, divisa in tre aliquote da 32 µl ciascuna ed incubata per 1 ora a 37 °C. Quindi la reazione è stata bloccata aggiungendo 130 µl di etanolo a ciascun aliquota. I lipidi sono stati estratti in 600 µl di esano. Dopo aver recuperato la fase organica (surnatante), la fase acquosa è stata nuovamente sospesa con 500 µl di soluzione per l'estrazione, così come anche la terza estrazione. L'esano è stato rimosso, sotto cappa, con un *soffio* di azoto, mentre, i lipidi essiccati sono stati sciolti in 50 µl di cloroformio. Gli esteri del colesterolo sono stati separati dal colesterolo mediante cromatografia su strato sottile, utilizzando, come fase mobile, etere di petrolio, etere dietilico ed acido acetico (90:30:1, v:v:v). Le macchie lipidiche sono state visualizzate con i vapori di iodio e rinvenute con lo

scintillatore. L'attività dell'enzima è stato misurato come nmoli di colesterolo esterificato per h per ml di plasma ed espresso in unità.

2.2.7 Analisi statistica

Le analisi dei campioni per ELISA e per il saggio LCAT sono state effettuate in triplicato. I valori dei parametri analizzati sono espressi come media \pm deviazione standard o come media \pm errore standard. Le analisi di regressione lineare sono state ricavate utilizzando il programma di analisi statistica "Graph Pad Software, San Diego, CA, USA".

2.2.8 Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF)

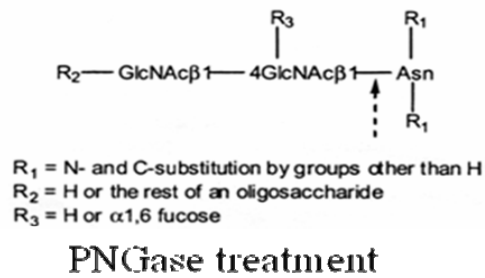
Dopo elettroforesi bidimensionale le isoforme di Hpt, distribuite nei diversi spot, sono state escisse da gel e analizzate mediante MALDI-TOF. In dettaglio, i singoli spot, corrispondenti alle glicoforme di β di Hpt, sono stati lasciati in 100 μ l (di una soluzione contenente 25 mM NH_2CO_3 pH 8,5 e 40% etanolo) per una notte. Successivamente sono stati posti in 20 μ l di una soluzione composta da 25 mM NH_2CO_3 e successivamente equilibrati in acetonitrile. I pezzetti di gel sono stati prima essiccati e poi risospesi in 3 μ l di 25 mM NH_2CO_3 e 0,2 μ g/ μ l di tripsina ingegnerizzata (non capace cioè di autodigerirsi) e incubati per un'intera notte a 37 °C. I peptidi così ottenuti sono stati escissi da gel mediante sonicazione in 15 μ l di 25 mM NH_2CO_3 e miscelati alla matrice utilizzata per l'analisi MALDI (in questo caso acido α -ciano-4-idrossicinnammico in 70% acetonitrile e 0,2% TFA). Aliquote di 5 μ l campione, così costituite, sono state direttamente adagate sulla piastra MALDI. Il campione, adeso alla matrice, è stato quindi bombardato con un fascio laser di azoto e quasi ionizzato. I parametri utilizzati sono stati: 25,00kV, 26,30 e 21,75 per l'accelerazione degli ioni e la successiva riflessione. I picchi relativi alle masse dei peptidi sono stati acquisiti con lo spettrofotometro Ultraflex II TOF-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipaggiato con un laser di 200Hz. Dai picchi ottenuti sono stati

eliminati i valori di massa relativi a frammenti triptici non glicosilati, ottenuti mediante digestione teorica con trispina della proteina presa in esame. Per risalire alla massa delle catene glicaniche, invece, sono state sottratte alle masse totali acquisite dall'apparecchio le masse relative ai tre peptidi (solo la sequenza aminoacilica) generati dalla digestione triptica. Tale calcolo matematico ha consentito di ottenere la massa delle catene glicaniche associata ai peptidi. Mediante l'utilizzo di un database (www.functionalglycomics.org) siamo risaliti alla composizione delle catene glicaniche stesse.

2.2.9 Analisi delle catene glicaniche

a) Rimozione degli zuccheri da Hpt mediante PNGasi F

Dopo aver determinato la concentrazione proteica di Hpt purificata mediante saggio ELISA, si è passati alla fase di distacco delle catene glicaniche dalla subunità β di Hpt. In dettaglio, a 50 μg di Hpt pura, sono stati aggiunti 0.2% SDS e 100 mM β -mercaptoetanolo (volume finale: 45 μL). La mix è stata incubata per 5 minuti a 100 °C in modo da denaturare le proteine. Successivamente sono stati aggiunti 5 μL di TRITON X-100 al 15% e 10 μL di PNGasi F (500 U.E./mL) in 50 Mm TBS a pH 7.5. Dopo l'aggiunta dell'enzima il materiale è stato incubato a 37 °C, in un bagnetto termostato, per un'intera notte. La PNGasi F (Peptide-N-glycosidase F) è uno degli enzimi più usati nei passaggi di deglicosilazione delle proteine; ha un peso molecolare di 36 KDa ed ha un massimo di attività in soluzioni a pH 8.6. Tale enzima ha la capacità di staccare esclusivamente le catene glicaniche legate all'asparagina (N-linked) mediante idrolisi del gruppo NH_2 dell'asparagina stessa. La reazione enzimatica è stata bloccata incubando per 5 minuti il campione a 100 °C.



b) Derivatizzazione della catena glicanica.

Dopo aver verificato l'avvenuta deglicosilazione della proteina mediante elettroforesi, è stata effettuata la fase di ancoraggio del cromoforo alle catene glicaniche presenti nella mix. Il cromoforo utilizzato è la 2-amminobenzamide (2-AB), che è un fluorescente con un massimo di eccitazione a 320 nm e un massimo di emissione a 420 nm. Per tale motivo tutte le fasi sperimentali successive sono state condotte rigorosamente al buio o proteggendo i campioni da fonti luminose. Il legame del cromoforo allo zucchero avviene mediante due reazioni:

Formazione della base di Schiff's; il gruppo amminico del cromoforo effettua un attacco nucleofilo al carbonio carbonilico del residuo terminale acilico ridotto dello zucchero per formare una base di Schiff's parzialmente stabile.

La stessa base di Schiff's viene parzialmente ridotta per formare un complesso stabile.

Viene quindi preparata una mix, detta labeling mix, composta da 2 mL di acido acetico puro, 3.5 mL di dimetilsolfossido (DMSO), 0.68 M di NaCNBH₄ e 0.24 M 2-AB per un volume finale di 5 mL. Vengono quindi aggiunti 5 μ L di tale mix alla proteina digerita ed il tutto viene incubato per 3 ore a 70 °C. Dopo l'incubazione, il nostro campione è ancora composto da peptidi e catene glicaniche a cui si è stabilmente ancorato il cromoforo. Il passo successivo è quindi la purificazione degli zuccheri attraverso l'utilizzo di colonne Discovery DPA-6S (volume totale: 1 mL). Tali colonne sono caratterizzate da una fase stazionaria solida che assorbe gli zuccheri mediante interazioni idrofobiche. Il primo step è l'idratazione della matrice

della colonna con 2 mL di aceto nitrile puro a cui segue la carica del campione e la fase di lavaggio nella colonna. Questa fase consente la rimozione del materiale presente nella mix di partenza che non interagisce con la resina e si effettua mediante il passaggio in colonna di 4 mL di acetonitrile/acqua (99:1). Segue un ulteriore lavaggio con 0.5 mL di acetonitrile/acqua (97:3) e l' eluizione degli zuccheri, rimasti attaccati alla resina con 4 mL con 0.5 M acido formico. Le catene glicaniche così purificate vengono concentrate sotto flusso d' azoto e risospese in 100 µL di 250 mM ammonio formato/aceto nitrile (65:35).

c) HPLC

Per ottenere il pattern di eluizione degli zuccheri rimossi dall'Hpt dei due gruppi di studio, è stata eseguita una cromatografia liquida in fase normale a flusso interrotto. La colonna utilizzata è una TSKgel Amide-80 di 4.6 mm di diametro, 25.0 cm di lunghezza e impaccata con particelle di silice sferiche di 5 µm legate covalentemente con gruppi carbammidici. Il solvente usato per impaccare è acetonitrile/acqua.

E' stata effettuata un' eluizione tramite gradiente, in cui i solventi per la corsa degli zuccheri nella colonna sono: il solvente A (100% acetonitrile) ed il solvente B (250 mM ammido formato pH 4.4). Il gradiente è stato il seguente:

- ✓ 0-75 min è passato da 35% a 65% B
- ✓ 75-80 min è passato da 69 a 100% B
- ✓ 80-83 min è passato 100% B
- ✓ 83-85 min è passato da 100% a 35% B
- ✓ 85-115 min è passato 35% B

Il meccanismo della separazione si basa sulla capacità dell'analita di spiazzare le molecole della fase mobile che sono adsorbite come un unico strato sulla superficie della fase stazionaria, così come sulle proprietà dell' analita di competere con le molecole di fase mobile per la formazione di un doppio strato sulla superficie di fase stazionaria.

L'ordine di eluizione degli analiti è tale che viene eluito per primo quello meno polare. Iniettando, in colonna, delle catene glicaniche standard e delle malto destrine, come calibratori della corsa, è stato possibile convertire il tempo di eluizione di ogni picco del cromatogramma in unità di glucosio. Servendoci, anche in questo caso, di un database disponibile *on-line* (<http://glycobase.ucd.ie>), siamo risaliti alla composizione di ogni picco cromatografico. Attraverso tale analisi abbiamo analizzato l'abbondanza di ogni picco, in relazione alla totalità della miscela glicanica iniettata in colonna, esprimendo l'area di ogni singolo picco in rapporto all'area totale del cromatogramma.

2.2.10 Estrazione della miscela proteica dalla lesione psoriasica

Lo strato superficiale della placca psoriasica è stata ottenuta mediante sfregamento della lesione con una spatolina sterile. Il materiale è stato quindi, istantaneamente congelato, con azoto liquido, e omogenato mediante l'utilizzo di un mortaio. La pelle, finemente sbriciolata è stata risospesa in un tampone di estrazione (250 mM saccarosio, 10 mM HEPES pH 7, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF e 0.5 % deossicolato) in un rapporto 1:10 g/v. Il materiale, solubilizzato, è stato lasciato 15 min a 4° C e successivamente centrifugato per 30 min a 7,500g. Mediante tale fase è stato ottenuto un precipitato che, recuperato, è stato risospeso nel tampone precedentemente descritto e ricentrifugato (alle stesse condizioni). Il pellet riformato (da quest'ultima centrifugazione) è stato risospeso in un tampone ad alta concentrazione salina (275 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8 e 1 mM PMSF 1:10 g/v) e lasciato in agitazione magnetica a 4° C per una intera notte. Il giorno successivo il materiale è stato centrifugato a 20,000 g per 30 min. Per estrarre Hpt da tale miscela proteica, il materiale è stato caricato su una resina con anticorpo anti-Hpt legato alla fase stazionaria.

Risultati e Considerazioni

3.1.1 Titolazione di Hpt in plasmi di psoriasici e donatori sani

Un primo approccio, per il presente lavoro di tesi di dottorato, è stato effettuato valutando la concentrazione di Hpt in plasma di psoriasici, rispetto a quella riscontrata in donatori sani di controllo. In condizioni fisiologiche, Hpt è presente nel plasma in un *intervallo* di concentrazione che va da 0,38 mg/mL a circa 2,27 mg/mL. Tuttavia, questo valore può aumentare di 10-20 volte durante le prime fasi dell'inflammatione o in seguito a neoplasie; oppure, può diminuire durante l'insorgenza di malattie epatocellulari o in seguito ad emolisi.

La titolazione di Hpt nel plasma ha permesso di valutare lo stato infiammatorio dei pazienti rispetto ai controlli. In dettaglio, i livelli di Hpt sono stati titolati, in plasma di psoriasici (N = 20) quanto in quelli di controllo (N = 20) mediante ELISA. Uguali quantità di plasma sono state poste in pozzetti della piastra ELISA e, mediante l'utilizzo di anticorpo anti-Hpt, del relativo anticorpo secondario e della soluzione di sviluppo, si è ottenuta intensità di colore proporzionale alla quantità di proteina presente in pozzetto. Utilizzando, inoltre, una retta di taratura, ottenuta con concentrazioni note di Hpt commerciale, si è potuto stabilire la relazione tra intensità di colore e concentrazione proteica. Da questa analisi si è evinto che la concentrazione di Hpt, in plasma di psoriasici, è circa 2,53 volte più concentrata rispetto ai controlli ($3,56 \pm 0,237$ mg/mL rispetto a $1,4 \pm 0,16$ mg/mL) (**Fig. 1**). Anche in psoriasi, dunque, come in altre patologie infiammatorie, la concentrazione di Hpt, in circolo, aumenta in modo sostanziale.

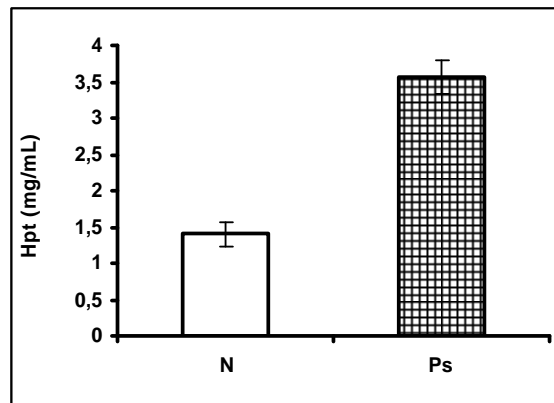


Fig 1. Titolazione di Hpt. La quantità di Hpt presente nel plasma dei donatori di controllo (barra bianca) e di psoriasici (barra quadrettata), è stata titolata mediante ELISA. I risultati, espressi in grafico come mg/mL di Hpt, sono la media delle concentrazioni ottenute in seguito alla titolazione dei diversi campioni.

Analogamente, data l'elevata incidenza di disfunzioni metaboliche e predisposizione a rischi cardiovascolari in pazienti con psoriasi, abbiamo voluto titolare la concentrazione di ApoA1 (un'apolipoproteina delle HDL, marcatore di rischio di difettivo trasporto inverso del colesterolo) in plasmi dei medesimi pazienti quanto dei donatori di controllo. Analogamente a quanto fatto nel precedente esperimento, quantità scarsi di plasma sono state piastrate in pozzetti ELISA. Dopo incubazione con anti-ApoA1, relativo anticorpo secondario e la soluzione di sviluppo, si è potuto ottenere colore in misura proporzionale alla concentrazione, in questo caso di ApoA1, presente nel plasma. Analogamente a quanto prima, servendoci di una proteina standard, commerciale, piastrata nei pozzetti ELISA in una serie di concentrazioni note, è stato possibile convertire l'intensità di colore nella concentrazione proteica corrispondente. Diversamente a quanto atteso, però, la concentrazione di ApoA-1 presente nei plasmi Ps è del tutto paragonabile a quella riscontrata nei plasmi di controllo ($1,108 \pm 0,095 \mu\text{g/mL}$ e $1,12 \pm 0,073 \mu\text{g/mL}$ rispettivamente).

3.1.2 Prevalenza fenotipica di Hpt in psoriasi

Hpt, purificata da plasma di psoriasici (N = 46) e di donatori sani (N = 44), è stata selezionata positivamente mediante cromatografia di affinità, usando Hb come ligando della fase stazionaria. Il fenotipo di Hpt è stato determinato mediante elettroforesi, sottoponendo la proteina dei diversi campioni a un campo elettrico, su gel di poliacrilammide al 6%, in condizioni denaturanti e non riducenti

In dettaglio, dopo elettroforesi, il gel è stato colorato con Coomassie che ha evidenziato bande proteiche migrate in base al loro peso molecolare. È noto che, mentre il fenotipo Hpt 1-1 è rappresentato da un'unica banda di 86 kDa, il fenotipo Hpt 2-2 e il fenotipo Hpt 1-2 sono caratterizzati da più bande, corrispondenti a diverse isoforme. Infatti, Hpt 2-2 è caratterizzato da bande di 149, 199, 249 e 299 kDa, mentre Hpt 1-2 da bande di 86, 136, 185, 235 e 269 kDa. (Fig. 2).

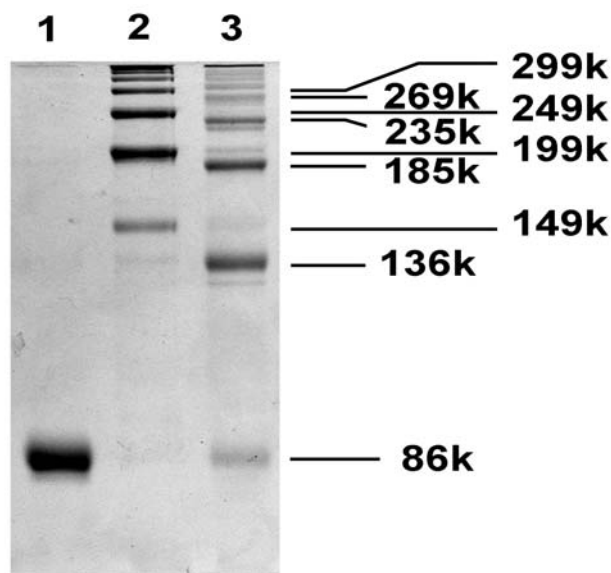


Fig. 2 Fenotipi di Hpt. Hpt è stata purificata mediante cromatografia di affinità con Hb legata alla fase stazionaria della colonna. Aliquote di 40 µg sono state caricate su pozzetti di gel di poliacrilammide al 6%. È stata quindi effettuata una elettroforesi in condizioni denaturanti e non-riducenti. Le bande proteiche relative al fenotipo 1-1 (tracciato 1), 2-1 (tracciato 2) e 2-2 (tracciato 3) sono state colorate con Coomassie R250. I pesi molecolari delle differenti isoforme sono posti a destra e sono in accordo con quanto riportato in letteratura.

Come mostrato in **Tabella 1**, nei soggetti di controllo, in accordo alle informazioni inerenti la distribuzione fenotipica della popolazione Caucasica in Europa, si riscontra la prevalenza del fenotipo 1-2, mentre nessuna prevalenza fenotipica in soggetti affetti da psoriasi. Il numero di individui con fenotipo 1-1, invece, risulta essere troppo basso per potervi attribuire, con valenza statistica, una predisposizione alla patologia.

Fenotipi Hpt	Psoriasici (n=46)	Controllo (N=44)
1-1	3	2
1-2	22	24
2-2	21	18

Tab. 1 Prevalenza fenotipica di Hpt in psoriasi

3.1.3 Analisi comparativa dei contaminanti di Hpt in psoriasi e in condizioni fisiologiche

Analizzando, mediante elettroforesi, la purezza di Hpt (isolata dal plasma mediante affinità con Hb), è stato possibile notare che, generalmente, tale proteina è accompagnata da due tipi di contaminazioni. Queste ultime sono rappresentate, su gel di poliacrilammide al 15%, eseguito in condizioni denaturanti e riducenti, dalla presenza di una banda proteica di 66 kDa (probabilmente albumina) e una banda proteica di 26 kDa (probabilmente ApoA-1). Effettuando, inoltre, una analisi densitometrica dei gel ottenuti, è stato possibile notare che i contaminanti proteici sono ritrovati in maggiore quantità nei preparati di Hpt purificata da plasma dei donatori di controllo mentre sono presenti solo in tracce in quelli estratti da plasma Ps (**Fig. 3**).

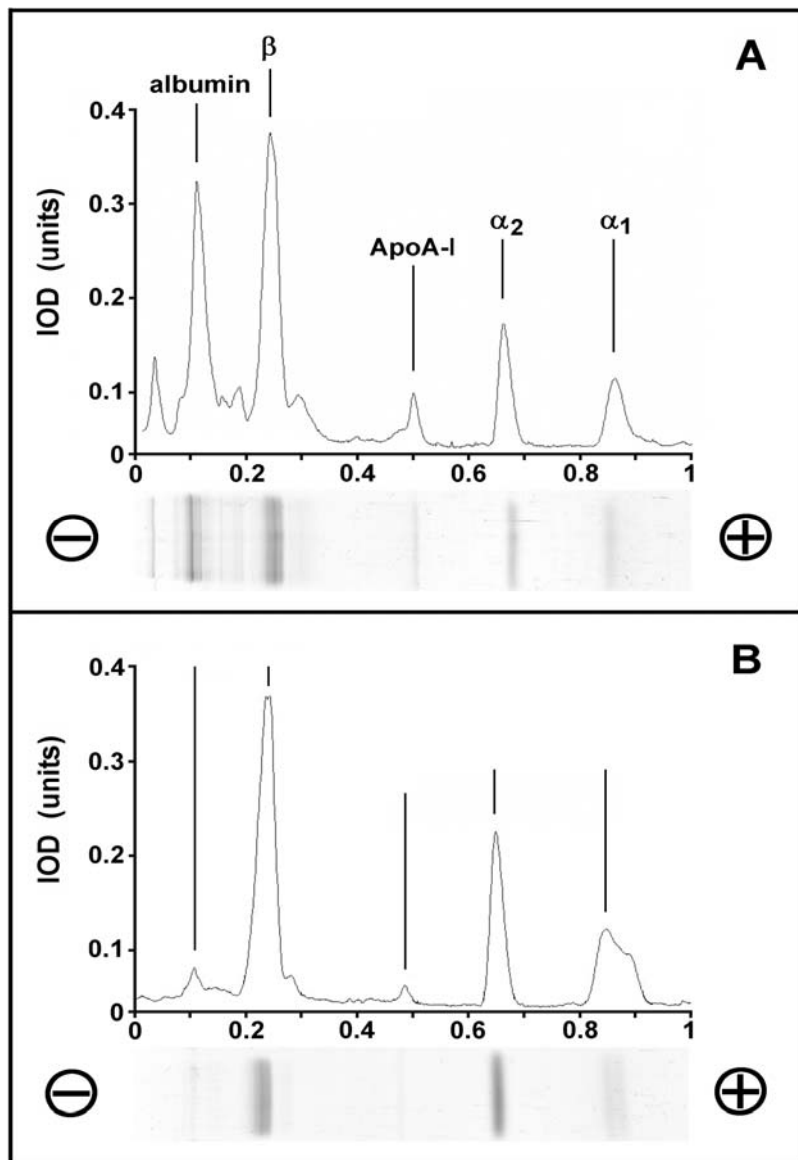


Fig. 3 Analisi densitometrica del tracciato elettroforetico di Hpt purificata. I campioni di Hpt, ottenuti mediante cromatografia di affinità con Hb, sono stati caricati su pozzetti di gel di poliacrilammide al 15% in condizioni denaturanti e riducenti. Dopo colorazione con Coomassie R-250 e un prolungato tempo di decolorazione in acido acetico 10%, i gel sono stati acquisiti mediante scanner ad una risoluzione di 600 pixel per inch. Le immagini sono state poi analizzate mediante il programma Gel-Pro, attraverso cui è stato possibile convertire l'intensità di colore di una banda in intensità di densità ottica (IOD). I densitogrammi rappresentano le variazioni della densità ottica in funzione della migrazione delle bande. In figura sono mostrati tipici densitogrammi di campioni di Hpt purificata da plasma di donatori di controllo (pannello A) e psoriasici (pannello B). Sono indicate la mobilità elettroforetica di albumina, ApoA-1 e delle catene β , e α di Hpt.

Questi risultati sembrano suggerire l'esistenza di differenze strutturali tra Hpt isolata dai due gruppi di studio. Potendo escludere che la minore presenza della banda proteica di 29 KDa (ApoA1), fosse relativa ad una minore concentrazione di partenza della proteina, si è proceduto all'analisi dell'affinità di Hpt, dei due distinti gruppi, verso i suoi ligandi fisiologici, che sono Hb e ApoA-1.

3.1.4 Binding di Hpt ad emoglobina e ApoA-1

La comparazione dell'affinità di legame di HptPs (purificata da plasma di psoriasici) e HptN (purificata da plasma di donatori sani di controllo) con Hb e ApoA-1 è stata eseguita mediante ELISA. Lo studio del legame tra Hb e Hpt è stato eseguito come segue: 50 µl di Hb (6,6 ng/µL) sono stati incubati nei pozzetti della piastra ELISA per un'intera notte a 4° C. Si è proceduto, poi, alla cosiddetta fase di *binding*, in cui sono state utilizzate diluizioni crescenti di Hpt (0,3, 0,2, 0,1 µM) purificata da un pool di donatori di controllo (di cui due con fenotipo 2-1 e due con fenotipo 2-2) e, con Hpt purificata da pool plasmatici di psoriasici (idem per fenotipi). Il legame di Hpt ad Hb è stato monitorato aggiungendo, in ogni pozzetto, anticorpo primario (anti-Hpt di coniglio) e, successivamente, il relativo anticorpo secondario (anti IgG di coniglio da capra) legato a perossidasi. Come mostrato in **figura 4**, in cui l'assorbanza ottenuta, dopo lo sviluppo, è posta in funzione della concentrazione di Hpt aggiunta al pozzetto, il legame Hpt-Hb è maggiore per Hpt di controllo che per Hpt da psoriasici. Inoltre, appare evidente che questa maggiore affinità di legame di Hpt di controllo, rispetto ad Hpt di Ps, è rappresentata per tutte le concentrazioni piastrate. Questo risultato potrebbe spiegare quindi, sebbene solo in parte, il motivo per cui Hpt purificata da donatori di controllo viene coeluita con Hb.

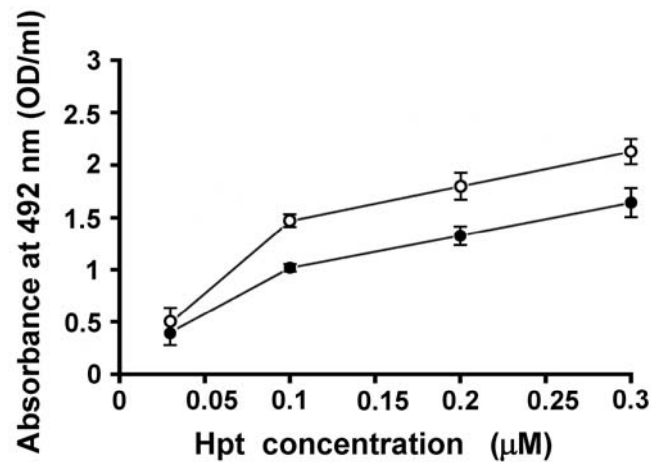


Fig. 4 Legame di Hpt, purificata da donatori N e Ps, ad emoglobina. Hpt purificata da entrambi i gruppi di indagine è stata purificata da persone con fenotipo 1-2 e 2-2. I pozzetti della piastra ELISA sono stati incubati con Hb e, successivamente, con uguali quantità di Hpt di psoriasici (cerchio pieno) e di controllo (cerchio vuoto). È stato usato poi anticorpo anti-Hpt in coniglio per identificare il complesso Hb-Hpt. Dopo incubazione con GAR-HRP e o-phenylenediamine in presenza di H₂O₂, i complessi sono stati rivelati attraverso la misura dell'assorbanza del colore generato, con la soluzione di sviluppo, a 492 nm. I valori a 0,1, 0,2 e 0,3 µM sono significativamente differenti nelle due condizioni.

Un esperimento analogo è stato effettuato condizionando i pozzetti della piastra ELISA con 50 µL di ApoA-1 (6,6 ng/µL). La procedura è identica a quella descritta sopra, solo che, nella fase di *coating*, è stata utilizzata ApoA-1 come ligando di Hpt. Nella fase di *binding*, sono state utilizzate diluizioni a concentrazione crescente di Hpt (0,3, 0,2 e 0,1 µM). Alla fase di *binding* è seguita l'incubazione con anticorpo anti-Hpt di coniglio e anticorpo anti-anticorpo di coniglio da capra coniugato a perossidasi. Anche in questo caso,, a parità di concentrazione di ApoA-1 presente nel pozzetto, il legame di Hpt aumenta all'aumentare della sua concentrazione (**Fig. 5**). L'assorbanza,ottenuta a 492 nm (dopo sviluppo della reazione della perossidasi) è stata riportata in funzione della concentrazione di Hpt nel pozzetto.

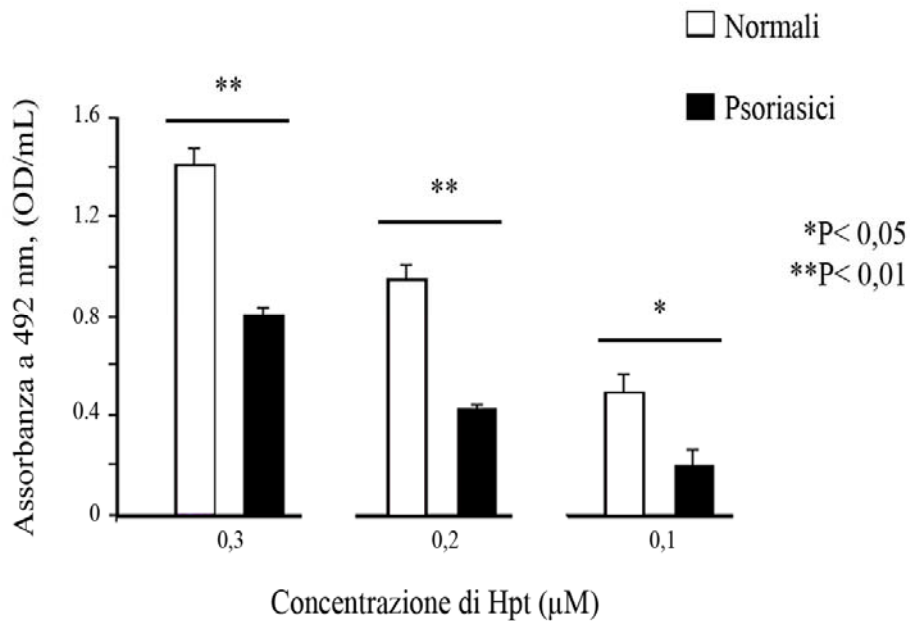


Fig. 5 Legame di Hpt, purificata da donatori N e Ps, ad ApoA-1. Hpt, da entrambi i gruppi di indagine, è stata purificata da persone con fenotipo 1-2 e 2-2. I pozzetti della piastra ELISA sono stati incubati con ApoA-1 e, successivamente, con uguali quantità di Hpt di psoriasici (barra scura) e di controllo (barra chiara). È stato usato poi anticorpo anti-Hpt in coniglio per identificare il complesso ApoA-1-Hpt. Dopo incubazione con GAR-HRP e o-phenylenediamine in presenza di H₂O₂, i complessi sono stati rivelati attraverso la misura dell'assorbanza del colore generato, con la soluzione di sviluppo, a 492 nm. I valori a 0.1, 0.2 e 0.3 μM sono significativamente differenti nelle due condizioni (**P < 0.001 e *P < 0.05).

Poiché un cambiamento della struttura amminoacidica di Hpt è altamente improbabile, la variazione delle attività di Hpt potrebbero essere attribuibili ad un variazione della composizione delle catene glicaniche di Hpt. Le catene carboidratiche, infatti, sono coinvolte nel mediare le interazioni proteina-proteina e nell'influenzarne la stabilità.

3.1.5 Binding di Hpt ad ApoA-1 mediante dosaggio enzimatico di LCAT

Per analizzare ulteriormente la differenza nell'affinità di legame che HptPs instaura con ApoA-1, è stato effettuato il dosaggio dell'enzima LCAT. Rifacendoci infatti alla letteratura, in cui è riportato che Hpt, legandosi ad ApoA-1, inibisce l'attività di LCAT, abbiamo monitorato la funzionalità dell'enzima quando incubato con le due diverse Hpt (Ps e N). Il saggio sfrutta il legame tra LCAT ed ApoA-1, in seguito al quale l'enzima, attivato, converte colesterolo in esteri del colesterolo. In dettaglio, se ad ApoA-1 si lega Hpt, l'attività dell'enzima LCAT diminuisce. Sperimentalmente, l'attività di questo enzima è stata misurata utilizzando, come substrato, un proteoliposoma formato da ApoA-1:lecitina:H³colesterolo, nelle proporzioni di 1,5:200: 1,8 e, come fonte di LCAT, una miscela di plasmidi deprivata di HDL (precipitate mediante destran solfato:DS). Per la realizzazione dell'esperimento, sono state utilizzate due concentrazioni di Hpt (0,5 e 2 µM) purificata da pazienti e donatori sani. Dopo incubazione, l'inibizione dell'attività enzimatica è stata monitorata mediante la conta di esteri di colesterolo radioattivi. Come è possibile notare dalla **figura 6**, l'inibizione dell'enzima è maggiore per Hpt purificata da plasma di controllo, rispetto a quella purificata dagli psoriasici. La differenza tra i due pool, nell'inibizione di LCAT, suggerisce che esiste una differenza tra i due tipi di Hpt, che rende la proteina HptPs meno capace di legare ApoA-1.

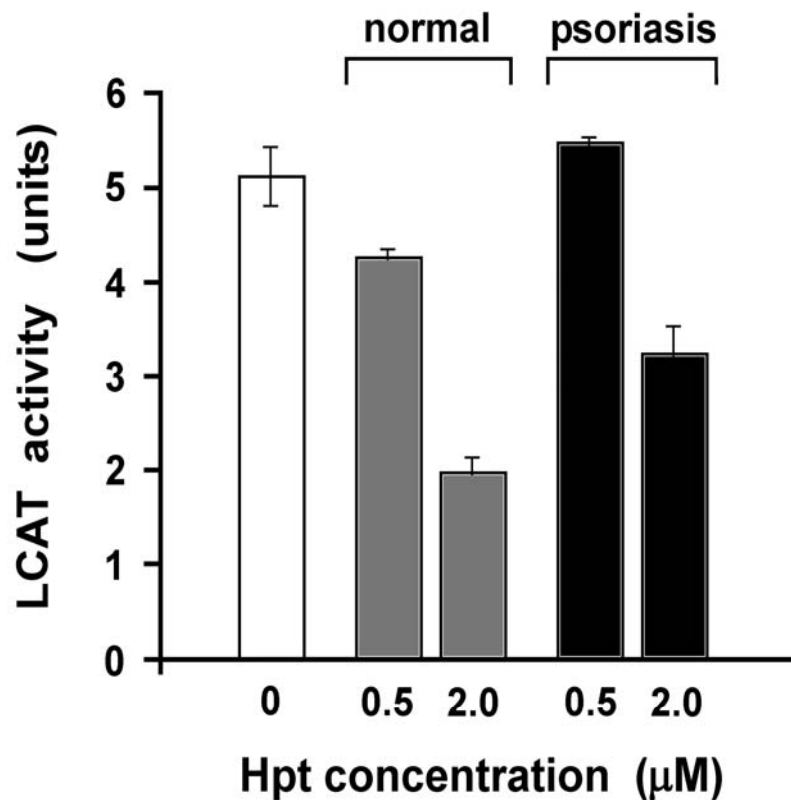


Fig. 6 Inibizione dell'attività di LCAT. L'attività di LCAT è stata misurata in *pool* plasmi trattati con DS e incubati con una miscela di reazione contenente un proteo liposoma (ApoA-1: lecitina: H³ colesterolo, 1,5:200:1,8 come rapporto molare) come substrato. L'attività di LCAT è espressa come nanomoli di colesterolo radioattivo, incorporati per ora per mL di plasma. Le analisi sono state eseguite in triplicato ed i risultati sono espressi come media \pm errore standard. Il controllo della reazione, rappresentato dall'attività dell'enzima in assenza di Hpt (barra bianca), è significativamente differente da quella ritrovata con entrambe le concentrazioni di Hpt (0,5 e 2 μ M) e l'attività dell'enzima è significativamente differente anche tra le stesse concentrazioni di Hpt da Ps e N ($P < 0.001$).

3.1.6 Commenti e considerazioni

Benchè il fenotipo di Hpt sia un elemento tramite il quale è possibile determinare la predisposizione di un individuo a numerose patologie, ciò non è valido per la psoriasi. In letteratura non sono riportati dati di prevalenza fenotipica di Hpt in psoriasi, né, tantomeno, i nostri studi ci consentono di attribuire una prevalenza fenotipica nella patologia. Tale risultato si discosta da quanto atteso, visto che, in letteratura, è riportato che il fenotipo 2-2 di Hpt stimola processi angiogenici (Cid MC. et al., J. Clin. Invest.1993). L'angiogenesi infatti è uno degli eventi responsabili del rimaneggiamento del tessuto epiteliale in psoriasi visto che assicura ossigeno e sostanze nutrienti indispensabili per la sopravvivenza dell'organo perfuso. La prevalenza del fenotipo 2-2 è stata, inoltre, riscontrata in numerose patologie e sembra essere associata all'insorgenza di rischio cardiovascolare. L'ulteriore *link*, che ci ha fatto presupporre una maggiore frequenza del fenotipo 2-2 in psoriasi era costituito dalle ormai numerosissime evidenze, secondo cui i soggetti affetti da psoriasi hanno disfunzioni metaboliche e un'alta frequenza di rischio cardiovascolare (Vakkee M. et al, Atherosclerosis 2007). Tali problemi associati alla psoriasi, sono tanto evidenti quanto grave ed estesa è la psoriasi stessa (Ludwing RJ et al., Br. J. Dermatol. 2007). Quindi, non avendo riscontrato nessun tipo di prevalenza fenotipica, non è da attribuire a Hpt il legame che c'è tra psoriasi e rischi cardiovascolari.

Per quanto riguarda invece il legame che c'è tra la patologia e la disfunzione metabolica, abbiamo voluto indagare su come Hpt possa svolgere un ruolo inibitorio su LCAT. Nel trasporto inverso del colesterolo, l'enzima LCAT esterifica il colesterolo, accumulato nelle membrane delle cellule periferiche, solo se attivato da ApoA-1 presente sulle HDL. È ormai noto che Hpt, interagendo con lo stesso sito di ApoA-1 che è coinvolto nel legame a LCAT, inibisce l'attività dell'enzima e, svolgendo tale ruolo negativo, lascia accumulare colesterolo sulle membrane delle cellule periferiche e, quindi, contribuisce all'insorgenza di placche aterosclerotiche nella parete dei vasi sanguigni. Tramite gli esperimenti di *binding* ad ApoA-1, effettuati mediante ELISA e mediante il dosaggio dell'attività enzimatica

dell'enzima LCAT, abbiamo notato che HptPs lega con minore efficienza Apo-A1 e, quindi, inibisce in minore misura l'enzima, rispetto a quella purificata da donatori di controllo. Non si può escludere, comunque, che quanto ottenuto *in vitro*, si discosti da quanto avverrebbe *in vivo*, in quanto, in un paziente psoriasico, la stessa ApoA-1 o, addirittura, LCAT potrebbe differire dalle forme circolanti in condizione fisiologica. Ciò che si può quindi affermare è che, in un sistema dove l'unica variabile è rappresentata da Hpt, si riscontra la tendenza a favorire il processo di degradazione del colesterolo. In questo caso, quindi, si potrebbe pensare che le modifiche strutturali di Hpt, siano legate anche alla esigenza di mandare in circolo una proteina non capace di bloccare processi che porterebbero ulteriori problemi all'organismo.

L'esperimento di *binding* di Hpt ad ApoA-1 o Hb, quindi, ci fa pensare che, in circolo, sia presente una forma di Hpt non capace di svolgere le sue attività principali.

Inoltre, essendo riportato in letteratura che il legame che Hpt instaura con i suoi ligandi dipende, in parte, anche dalle catene glicaniche ad essa associate, abbiamo voluto analizzare specificamente la componente glucidica di Hpt.

In conclusione, quindi, avendo riscontrato delle variazioni funzionali di Hpt, abbiamo voluto appurare se esse fossero legate a una variazione in glicosilazione della stessa.

3.2.1 Elettroforesi bidimensionale

Hpt isolata da plasma di donatori sani (N=9) o di donatori affetti da psoriasi (N=5) sono state separate mediante elettroforesi bidimensionale. Benché come riportato da banche-dati (Swiss-2D PAGE www.expasy.org/swiss-2dpage/ac=P00738), le isoforme della catena β di Hpt siano rappresentate da ben 19 spot differenti, è possibile, generalmente per motivi tecnici, che non tutti gli spot siano rivelabili. Inoltre, materiale con caratteristiche di pI e PM simili può sovrapporsi, durante la corsa elettroforetica, fino a formare un unico spot eterogeneo con una o più isoforme di Hpt.

Nel nostro caso, sono stati identificati 9 spot di Hpt, chiaramente separati gli uni dagli altri e arbitrariamente denominati A, B, C, D, E, F, G, H, I (**Fig.7**).

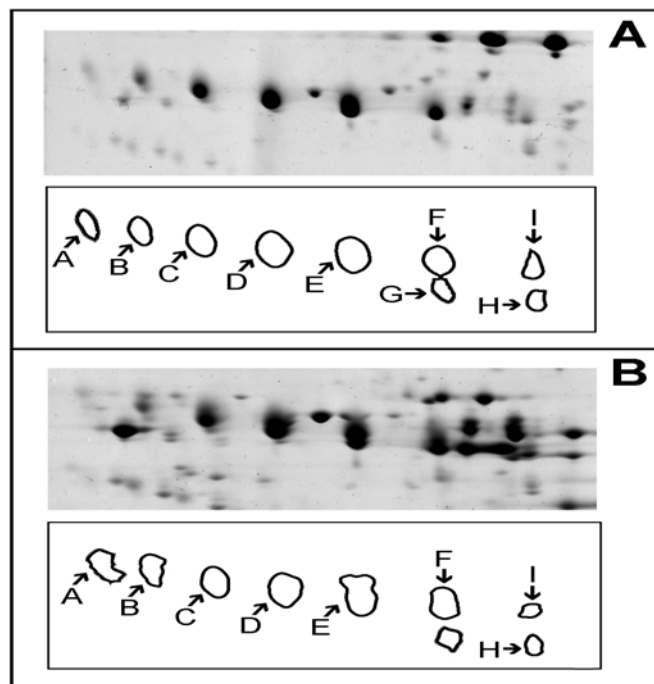


Fig. 7 Elettroforesi bidimensionale di plasma. Spot relativi alla catena β di Hpt, dopo elettroforesi 2D, di plasma da donatori di controllo (A) e psoriasici (B). Le proteine sono state separate, in prima dimensione, in base al loro pI e, in seconda dimensione, in base al loro PM.

Spot	Mw delle isoforme (kDa)	pI delle isoforme
A	44.5	4.8
B	44.4-43.1	4.9
C	43.4-42.1	5.0
D	42.1-41.4	5.1
E	42.2-41.3-40.7	5.2
F	42.0-40.8	5.4
G	38.7	5.4
H	38.5	5.6
I	40.4	5.6

Tab. 2 Attribuzione di Mw e pI degli spot di Hpt mediante confronto con quanto riportato in banca dati.

A ciascuno spot, con l'aiuto di una mappa di migrazione depositata in banca dati, disponibile sul sito suddetto, e con marcatori presenti su gel, è stato attribuito il corretto pI e PM (**Tab. 2**).

L'abbondanza relativa dei 9 spot, nella popolazione delle glicoforme della subunità β Hpt, è stata analizzata mediante il programma d'immagine Image Master 2d Platinum software (GE-Healthcare) (**Fig. 8**).

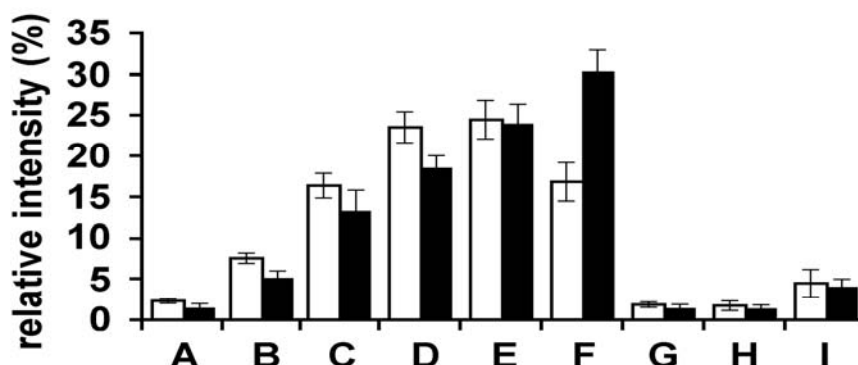


Fig. 8. Intensità di colorazione di Coomassie delle glicoforme della catena β di Hpt, separate mediante 2D gel e analizzate in triplicato mediante densitometria degli spot. I valori sono espressi, come unità arbitraria, come media \pm SD. Il valore dello spot F è significativamente differente ($P < 0.05$) nei pazienti, paragonato a quello dell'omologo spot di controllo.

Come appare dal grafico, tutti gli spot hanno una abbondanza paragonabile a quella relativa a pHpt. Solo lo spot F, in condizioni patologiche, è significativamente più abbondante rispetto a quello presente in condizioni normali (35 ± 2.7 su 17 ± 2.2 % Hpt). Ciò dimostra non solo che esistono delle differenze tra le glicoforme di Hpt, ma che esse devono essere ricercate tra le forme che compongono lo spot F, che comprende strutture con pI 5,4 e PM compreso tra 42,0 e 40,8 kDa. In base alla posizione di tale spot su gel, è possibile dedurre che tali strutture possono presentare, alternativamente, tutti i 4 siti di N-glicosilazione occupati da ramificazioni semplici (di tipo bi-antennario) o soltanto alcuni siti glicosilati, con catene molto ramificate.

3.2.2 Analisi MALDI dei glicopeptidi

Hpt, presente nel plasma di pazienti affetti da psoriasi (N=5) e donatori sani (N=5), è stata separata dalle altre proteine mediante elettroforesi bidimensionale e analizzata mediante MALDI. In particolare 4 spot (C, D, E, F), relativi ad Hpt sono stati escissi dal gel e incubati con tripsina, per la digestione della catena β della proteina. Il campione, poi, è stato fatto assorbire su una matrice e bombardato con un fascio laser, in atmosfera di azoto. In questo tipo di esperimento, la scelta della matrice da utilizzare è fondamentale, visto che essa induce la ionizzazione dell'analita, e consente al campione di volatilizzarsi in risposta alla radiazione laser in modo efficiente. I valori delle masse molecolari, rilevate da un appropriato sistema di misurazione, ottenute sono state comparate a quelle di un digesto triptico teorico di Hpt, in modo da eliminare i segnali di massa dei frammenti privi di ramificazioni glicaniche. Successivamente, a tutti i frammenti rimanenti è stato sottratto il peso dei peptidi prodotti dalla tripsinizzazione (nominati P₁-P₂-P₃), privi di catena glicanica (cioè considerando soltanto la massa totale dei loro residui amminoacilici). I frammenti generati dopo digestione

con tripsina sono tre: essi corrispondono alle sequenze aminoacidiche 18-41 (P_1 PM = 2679.39 Da), con 2 siti di N glicosilazione, 42-54 (P_2 PM = 1458.74 Da) e 75-90 (P_3 PM = 1795.01 Da). Da tale calcolo si è ottenuto, pertanto, un valore di massa esclusivamente relativo alla catena glicanica. In questo modo, non solo è stato possibile risalire al glicano presente sulla proteina, ma attribuirlo anche ad uno specifico frammento peptidico. Gli spettri di massa ottenuti dimostrano che, benché molti segnali, relativi alle masse dei frammenti, siano condivisi nelle due popolazioni, ci sono alcuni segnali che, invece, sono peculiari alla patologia. In particolare, almeno tre segnali (m/z 3418, 4320, 4976) sono stati rilevati soltanto in HptPS, mentre almeno due (m/z 3875 e 5560) sono stati ritrovati solo in HptN (**Fig. 9**).

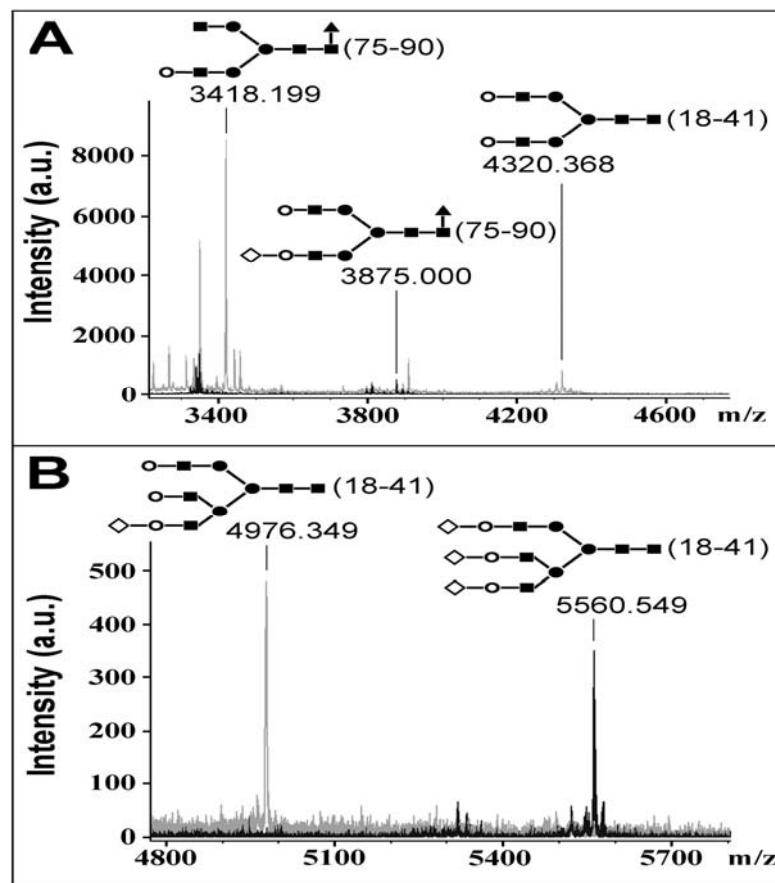


Fig. 9: MALDI-TOF Lo spettro mostra differenze dei glicani N-linked di Hpt da plasma di controllo (picchi chiari) e di psoriasici (picchi scuri). I frammenti analizzati sono stati recuperati da gel, dopo trattamento con tripsina .

La massa 3418 può essere attribuita ad una catena glicanica biantennaria incompleta e fucosilata (A_2G_1F) sul peptide P_3 ; tale catena glicanica è compatibile con la composizione di 4 esosi, 4 esosi N acetilati e 1 desossiosio. Il glicopeptide la cui massa è 3875 è compatibile con il frammento P_3 legato ad una catena glicanica biantennaria monosialata e fucosilata ($A_2G_2S_1F$), composta quindi da 5 esosi, 4 esosi N-acetilati, 1 acido neuramminico e un desossiosio. Le masse 4320 e 4976 sono relative a catene glicaniche presenti sul frammento P_1 e composte rispettivamente, da una catena biantennaria incompleta (A_2G_2) e una catena triantennaria monosialata ($A_3G_3S_1$), formata in un caso da 5 esosi e 4 esosi N acetilati e nell'altro da 6 esosi, 5 esosi N-acetilati e 1 acido neuroamminico. Infine, il glicopeptide con m/z 5560, ritrovato solo nel digesto triptico di HptN potrebbe essere il frammento P_1 con una catena glicanica triantennaria completa ($A_3G_3S_3$), composta cioè da 6 esosi, 5 esosi N-acetilati e 3 residui di acido neuroamminico.

I dati ottenuti dimostrano che la metodica di frammentazione (con tripsina) e analisi (con spettrometria di massa) consente di valutare le variazioni delle componenti glicaniche di Hpt legate alla patologia

3.2.3 Analisi HPLC delle catene glicaniche

Al fine di identificare le catene glicaniche di Hpt, è stata effettuata la purificazione dai due tipi di plasm (normale e di pazienti). I glicani sono stati rimossi dalla proteina mediante l'utilizzo dell'enzima PNGasi-F. Tali glicani sono stati successivamente derivatizzati (mediante incubazione col cromoforo 2-aminobenzammide) al terminale non riducente della catena, purificati (mediante estrazione in fase solida) e frazionati mediante HPLC. L'interazione degli zuccheri con i gruppi carbamidici della fase stazionaria, ha consentito di eluire glicani a diversi tempi di ritenzione, con

un gradiente di acetonitrile (da 65 a 0% in H₂O) e acido formico (da 87,5 mM a 250 mM pH 4,4) in 80 min ad una velocità di flusso di 0,4 mL/min.

Oltre ai campioni da analizzare, è stata iniettata, sulla colonna di HPLC, anche una miscela di oligosaccaridi standard (da 1 a 20 unità di glucosio) come calibratori della corsa chiamati pertanto GU.

I due cromatogrammi, ottenuti dai campioni normali o da quelli preparati dai pazienti, sono risultati pressoché sovrapponibili; infatti, sia i picchi maggioritari, sia quelli minoritari (nominati da **a** a **q**) sono presenti in entrambi i cromatogrammi (**Fig. 10**).

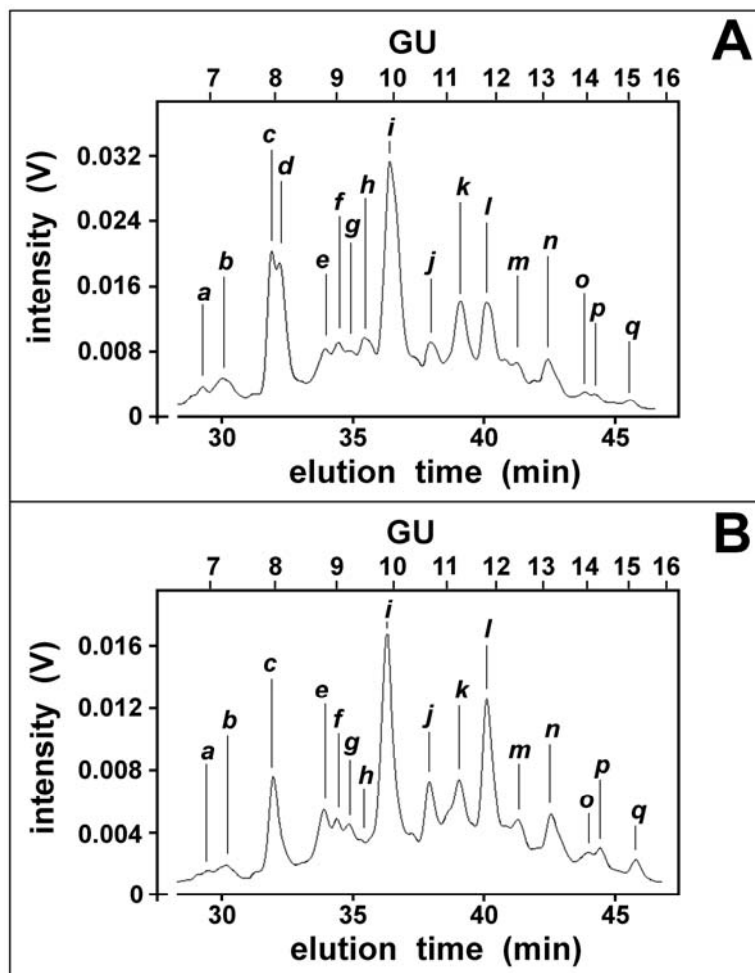


Fig. 10 NP-HPLC delle catene glicaniche derivatizzate con 2-AB. I cromatogrammi rappresentati in figura sono relativi alle catene glicaniche rimosse da Hpt purificata mediante PNGasi. Il cromatogramma A è relativo al profilo di eluizione della miscela di glicani ottenuta dalla digestione di Hpt di controllo, mentre il B a quello di psoriasici.

Peak	NP-HPLC GU	NP-HPLC % Area PS	NP-HPLC % Area N
a	6.97	0.59	0.86
b	7.24	1.84	3.02
c	7.97	6.84	6.8
d	8.06	0	8.55
e	8.80	4.01	4.44
f	9.02	3.4	3.64
g	9.23	3.79	2.68
h	9.44	1.36	5.73
i	9.88	22.15	25.46
j	10.68	7.6	5.51
k	11.25	12.1	10.83
l	11.79	14.96	9.08
m	12.45	5.1	2.85
n	13.17	7.4	4.34
o	14.0	2.51	1.04
p	14.3	2.94	0.49
q	15.18	0.803	0.24

Tab. 3 Tabella rappresentativa dei picchi eluiti e correlazione con i relativi GU.

In tabella sono rappresentate le unità di glucosio corrispondenti ai tempi di eluizione dalla colonna. La quantità di ogni picco è espressa come % sulla area totale del cromatogramma (sia della condizione patologica che di controllo).

La differenza, tra i due profili di eluizione, è relativa all'area dei picchi rivelati con lo stesso tempo di ritenzione (**Tab. 3**). Un unico picco, chiamato **d**, sembra associato alla condizione normale, in quanto è ritrovato esclusivamente nel profilo di eluizione del campione di controllo. Per quanto riguarda invece la differente distribuzione dei picchi, appare evidente che il materiale eluito a GU 6,97, 7,24, 9,40-9,60, 9,88 e 11,25

(picchi **a, b, h, i e k**) è più abbondante nel pattern di controllo, mentre quello corrispondente a GU 8,80, 9,23, 10,68, 11,79, 12,45, 13,17, 14,00, 14,30 e 15,18 (picchi **e, g, j, l, m, n, o, p e q** rispettivamente), è più abbondante nel campione preparato da HptPs.

Utilizzando una banca dati disponibile in rete (<http://glycobase.ucd.ie>), e le unità di glucosio, è stato possibile assegnare ad ogni picco le catene glicaniche corrispondenti. In particolare, è stato possibile fare assegnazioni per tutto il materiale eluito a valori di GU < 12. Per esempio, è stato trovato che strutture come FA₃BG₁, F₂A₂G₂S(2-6) e FA₂BG₂S(2-3) possono migrare come il picco **d**, e FA₂BG₂S₂, F₂A₃G₃ e A₃G₃S₂ come picco **h**. I picchi con GU>12, invece, pur non essendo presenti in database, sono attribuibili a catene molto ramificate o ricche di fucosio. Quindi, visto che la frazione di materiale eluito con GU>12 è maggiore in HptPs (18,7± 0.001.% vs 8,96 ± 0.0009 % in HptN) si potrebbe supporre che Hpt, in psoriasi presenta, in maggiore quantità, catene glicaniche altamente ramificate.

3.2.4 ELISA con lectine

Sulla base delle assegnazioni preliminari, è stata valutata la reattività di HptN e HptPs con le lectine LTA, ConA, MAA e SNA. Per rendere più evidenti i risultati della nostra analisi, è stata utilizzata anche Hpt estratta da un pool (N=3) di placche psoriasiche e purificata mediante affinità con anticorpi anti-Hpt. Tale materiale, chiamato sHpt, è stato assunto come contenente esclusivamente le glicoforme di Hpt prodotte dai cheratinociti. In dettaglio, le placche psoriasiche sono state congelate con azoto liquido, omogenizzate e, dopo aggiunta di un tampone (250 mM saccarosio, 10 mM HEPES pH 7,3, 5 mM EDTA e 1 mM PMSF), centrifugate (7,5 g per 30 min); il precipitato è stato risospeso in un tampone di estrazione (0,275 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 8, 1mM PMSF, 5 mM EDTA, 0,5 % deossicolato) e lasciato in agitazione magnetica a 4° C per tutta la notte. A ciò è seguita la centrifugazione del campione (20.000 g per 30 min) e il recupero della porzione solubile. Hpt è stata selezionata dalla miscela proteica mediante cromatografia di affinità con anticorpi anti-Hpt. Uguali

quantità di HptN, HptPs e sHpt sono state caricate su pozzetti di una piastra ELISA, in cui esse hanno interagito con le lectine, formando legami stabili in modo proporzionale alla concentrazione. La fase di incubazione con le lectine (opportunamente biotinilate) è durata tutta la notte ed è stata eseguita a 4°C. I complessi Hpt-lectina biotinilata sono stati rilevati con avidina perossidasi. Mediante l'aggiunta, in pozzetto, di una soluzione di sviluppo, contenente H₂O₂ e un bersaglio molecolare dei radicali prodotti dalla perossidasi, si è ottenuto un prodotto colorato ($\lambda = 492 \text{ nm}$) in misura proporzionale alla concentrazione dell'enzima legato all'avidina che, ovviamente, rispecchiava la concentrazione dei complessi formati tra lectina biotinilata e Hpt. La misura spettrofotometrica dell'assorbanza, a 492 nm, ha consentito di determinare la differente affinità delle lectine utilizzate per le proteine analizzate. Come mostrato in **figura 11**, HptPs presenta maggiore affinità, rispetto a HptN, per le lectine LTA e MAA, mentre minore reattività a ConA e SNA.

La risposta di HptPs alle diverse lectine è stata non solo confermata ma anche rafforzata da sHpt, che sembra, quindi, non solo avere una composizione glicanica differente da HptN, ma essere riversata in circolo in persone affette da psoriasi.

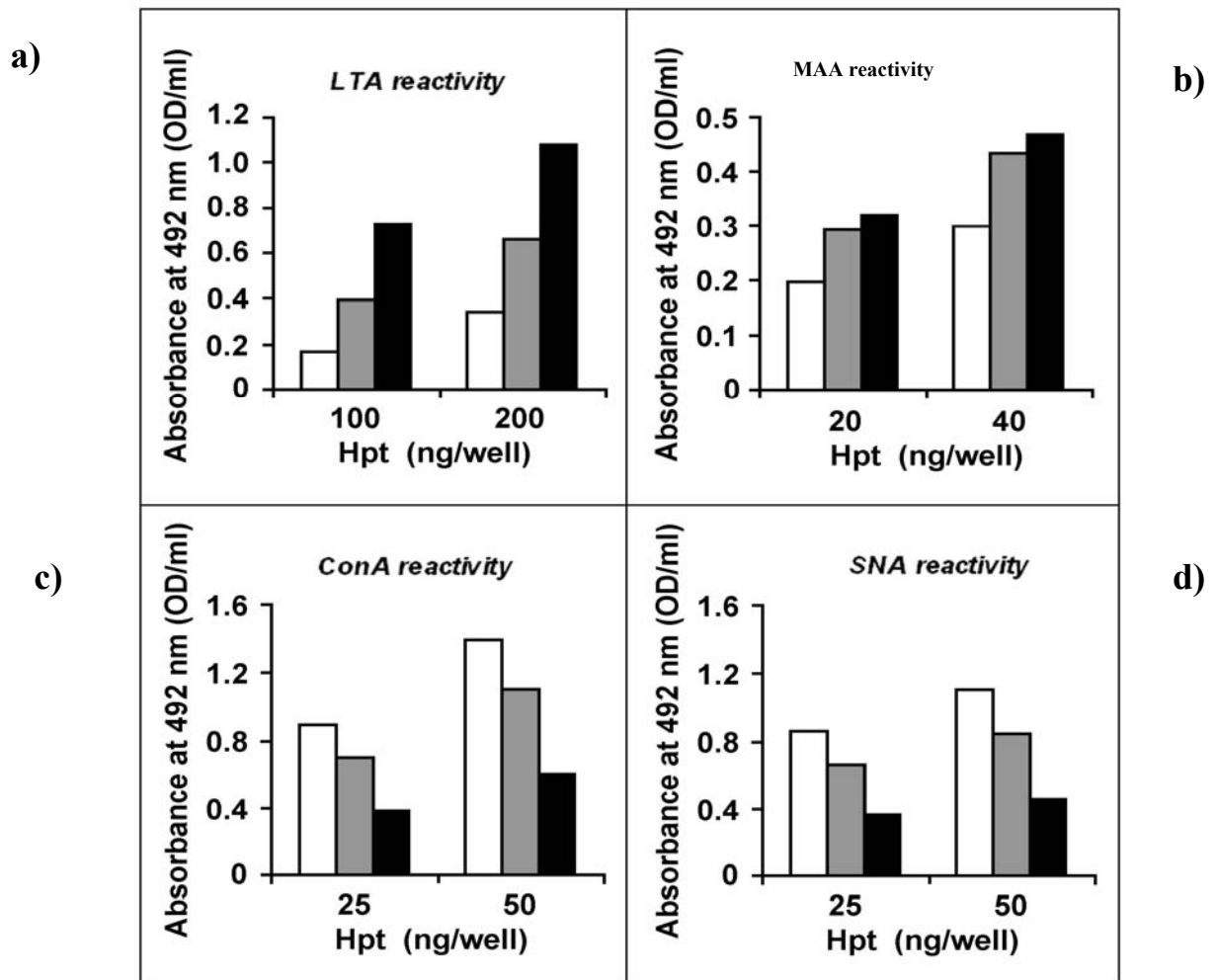


Fig. 11 Reattività di Hpt alle lectine. Le lectine utilizzate sono LTA (a), MAA (b), ConA (c), SNA (d). I pozzetti della piastra ELISA sono stati incubati con Hpt e, successivamente con 1 μ M di lectina biotinilata. È stato poi usata avidina coniugata alla perossidasi per identificare il complesso carboidrato-lectina. Dopo incubazione con GAR-HRP e o-fenilenediamine in presenza di H₂O₂, i complessi sono stati rivelati attraverso la misura dell'assorbanza del colore generato, con la soluzione di sviluppo, a 492 nm. La barra bianca dell'istogramma rappresenta la reattività di HptN, la barra grigia quella di HptPs e la barra nera, invece, la reattività a sHpt. Le analisi sono state fatte in triplicato e i valori ottenuti sono differenzialmente significativi tra HptN vs HptPs e HptN vs sHpt (P<0,01).

3.2.5 Commenti e considerazioni

Le glicoforme di Hpt umana sono state separate tramite 2D-PAGE. 9 spot maggioritari della catena β di Hpt, differentemente distribuiti su gel in base al loro pI e PM, sono stati riconosciuti mediante colorazione con Coomassie. Quest'analisi è stata effettuata su persone affette da psoriasi e in controlli sani. Attraverso tale approccio sperimentale, è stato possibile notare che il numero e la localizzazione degli spot di Hpt, nei due gruppi esaminati, sono invariati. Inoltre abbiamo evidenziato che, tra i due gruppi, cambia la quantità delle isoforme di Hpt che compone ogni singolo spot. In particolare, attraverso l'analisi densitometrica dei singoli spot, è stato possibile notare che nella patologia, il 32,5 % di Hpt è rappresentato da forme aventi pI 5.4 e PM 42,0-40,8 kDa, (spot F). In condizioni fisiologiche, invece, si riscontra una maggiore presenza di forme con pI compreso tra 5,2 e 5,1 e PM compreso tra 42,2 e 40,7 kDa (spot D ed E rispettivamente). Forme di Hpt molto sialate si localizzano intorno a pI 4,5; quindi, è possibile supporre che le subunità β dello spot F, siano glicoforme con quattro siti di N-glicosilazione completamente occupati da catene glicaniche poco ramificate (tipo biantennario). Tuttavia, è anche possibile che tali forme siano costituite da ramificazioni incomplete, prive cioè di acidi sialici terminali; in questo caso, tali forme di Hpt non dovrebbero presentare tutti e quattro i possibili siti di N-glicosilazione occupati: invece, esse dovrebbero avere preferenzialmente su alcuni siti, catene glicaniche altamente ramificate. Attraverso l'analisi densitometrica, è stato possibile effettuare una valutazione preliminare sulle possibili differenze tra i due gruppi di indagine. Questa metodica non ci ha proiettati positivamente verso le successive analisi.

Il materiale estratto dai singoli spot è stato sottoposto all'analisi MALDI-TOF MS. Con questa analisi, è stato possibile individuare la composizione delle catene glicaniche presenti sui frammenti triptici di Hpt e identificare il frammento a cui esse sono ancorate. Inoltre, è stato possibile notare che ramificazioni complesse sono montate prevalentemente sul peptide P₂ (45-54). Infine, in relazione allo spot F, nella patologia sono state ritrovate masse (come m/z 1517,75) associabili a catene ibride di mannosio

(HexNAc)₄Hex₈ e strutture tetra-antennarie-trisialate con composizione (HexNAc)₆Hex₇(NeuAc)₃ e massa di 3247,82. In questo specifico caso, dunque, è stata evidenziata sia la presenza di catene glicaniche altamente ramificate, sia di catene glicaniche incomplete. La tecnica utilizzata, comunque, ha un valore puramente qualitativo, e non dà nessuna informazione sull'abbondanza di alcune forme sulle altre. _

Il lavoro è proceduto con l'analisi delle stesse preparazioni di Hpt, mediante HPLC dei glicani ed ELISA delle proteine con lectine. Attraverso HPLC sono state analizzate esclusivamente le catene glicaniche di Hpt, precedentemente purificata mediante *salting out* e cromatografia di affinità con anticorpo. Dopo rimozione degli zuccheri, mediante l'utilizzo dell'enzima PNGasi, derivatizzazione degli stessi, mediante l'incubazione con un fluoroforo, e purificazione delle catene glicaniche derivatizzate, è stata effettuata l'iniezione dei campioni marcati in colonna. Sfruttando l'interazione tra il gruppo polare della fase stazionaria della colonna e i gruppi ossidrilici degli zuccheri, è stato ottenuto un cromatogramma risolutivo della miscela di glicani iniettata.

L'analisi dei glicani mostra, in entrambi i profili di eluizione, prevalenza di catene glicaniche, eluite come picco a 9.88 GU, corrispondenti a ramificazioni triantennarie monosialate altamente fucosilate. Un altro elemento lampante è la presenza di un picco, completamente assente nella patologia (picco **d**) e fluito con un tempo di ritenzione uguale a quello di catene glicaniche biantennarie fucosilate, triantennarie fucosilate (prive di acido sialico terminale) o a triantennarie non fucosilate (con 2 residui di acido sialico terminale). Mediante tale analisi è stato possibile verificare anche la quantità di catene glicaniche altamente ramificate, presenti nella patologia, rispetto a quelle presenti in condizioni di controllo (rappresentate nel nostro caso dalle forme eluite a GU>12). Si può notare che, benché tali forme siano maggiormente rappresentate in psoriasi (19% rispetto a 8.96%), esse, comunque, non sono le forme più rappresentate nella patologia a carico di Hpt. In psoriasi quindi, c'è un incremento di produzione di forme glicaniche a ramificazione complessa, ma tali forme non sono le maggioritarie. Le forme maggiormente presenti restano infatti biantennarie fucosilate e triantennarie incomplete. Attraverso tale analisi è stato, inoltre,

possibile evidenziare un incremento della produzione di catene glicaniche altamente fucosilate. A riprova di ciò, è stato condotto un ultimo esperimento, volto a verificare la maggiore o minore reattività, dei campioni analizzati, alle lectine. Le lectine utilizzate, per questo esperimento, sono state ConA, LTA, MAA e SNA. ConA riconosce specificamente il mannosio delle catene glicaniche, LTA i residui di fucosio, (siano essi localizzati sul residuo di N-acetilglucosammina iniziale del gruppo dichitobiosio del glicano o su un residuo identico ma localizzato su un'antenna della ramificazione), SNA specifici residui di acido sialico (legati al galattosio mediante legame glicosidico α 2-6) e MAA diversi residui di acido sialico (legati al galattosio mediante legame glicosidico α 2-3).

Attraverso quest'analisi, è possibile notare che Hpt, presente nel circolo sanguigno degli psoriasici, ha le stesse caratteristiche di quella purificata dalla placca psoriasica e reattività alle lectine differente da quella di Hpt purificata dal plasma di controllo. Si riscontra, infatti, minore reattività a ConA e a SNA, mentre maggiore reattività a LTA e MAA. La minore reattività di HptPs e di sHpt a ConA è indice di una maggiore ramificazione delle catene glicaniche. È riportato, infatti, che all'aumentare delle ramificazioni, delle catene glicaniche, diminuisce la reattività a tale lectina (Mohammad T. et al., *Glycoconj. J.* 1997). Ciò è dovuto all'evidenza che maggiore è il numero degli zuccheri che compone una catena glicanica, maggiore è l'ingombro sterico che essi generano: questa minore reattività a ConA è legata al fatto che il sito di legame tra lectina e specifico carboidrato è in parte mascherato. La minore reattività alla ConA, quindi, conferma quanto postulato fino a questo momento, cioè che nella patologia c'è sintesi di Hpt con catene glicaniche altamente ramificate. Studi effettuati sulle variazioni glicaniche di proteine infiammatorie, hanno evidenziato che l'aumento di fucosilazione delle catene glicaniche è strettamente correlato all'insorgenza di numerose patologie. Addirittura è stato riportato che, in caso di tumore pancreatico, la spiccata fucosilazione delle catene glicaniche scompare al regredire della patologia (Okuyama N. et al., *Int. J. of Cancer* 2005).

La maggiore reattività a MAA, potrebbe spiegare il motivo per cui, sulla base di una minore sialilazione delle catene glicaniche, sia stata riscontrata una differente funzionalità di Hpt rispetto a quella dei donatori di controllo. La presenza di acido sialico legato come “ α 2-3”, peculiare a ramificazioni glicaniche complesse (tipo tetraantennarie), predispone la proteina ad interagire con recettori di membrana differenti rispetto a quelli attivati dallo stesso residuo, ma legato come “2-6”. Ancora una volta in conformità alla letteratura, in condizioni fisiologiche c'è una maggiore sialilazione in α 2-6 rispetto alle condizioni patologiche.

4. Conclusioni

L'obiettivo principale di questa tesi di dottorato è stato quello di appurare se, in psoriasi, vi fossero delle modifiche a carico delle catene glicaniche della proteina plasmatica Hpt. La proteina è stata quindi purificata da plasma di donatori sani di controllo e da plasma di donatori affetti da psoriasi. Dato che è ormai noto che essa è sintetizzata anche dai cheratinociti della pelle è stato ritenuto fondamentale, per questo studio, purificarla anche dalla lesione psoriasica. L'evidenza (ottenuta mediante ELISA con lectine) che Hpt prelevata dalla lesione psoriasica, sia in parte, riversata nel torrente circolatorio, (vista l'analoga reattività alle lectine) valorizza tutti gli esperimenti condotti. Ancora, la differente reattività alle lectine di Hpt purificata da plasma di donatori di controllo, rispetto a quella purificata da plasma di donatori sani, dimostra che, di fatto, esiste una reale differenza tra le catene glicaniche di HptN e HptPs. Tutto ciò proietta positivamente, tale lavoro, verso ulteriori esperimenti volti a dimostrare la funzione di Hpt in colture cellulari. Nell'ambito della psoriasi sarebbe interessante paragonare gli effetti di HptN, HptPs e sHpt quando aggiunta in colture di linfociti B, linfociti T, macrofagi e cellule dendritiche.

Avendo infatti riscontrato che Hpt purificata da pazienti patologici non conserva la stessa funzionalità di quella presente in circolo, in condizioni fisiologiche, ci aspettiamo di rilevare *in vitro* un differente comportamento della stessa. Tali indagini potrebbero portare ad una riconsiderazione del ruolo fisiologico ed evolutivo di Hpt nota essenzialmente per la sua implicazione nel trasporto inverso del colesterolo e per la sua capacità di interagire con Hb. In definitiva, le nostre conclusioni si sposano con l'evidenza che l'organismo, per impedire un dispendio inutile di energia, preferisce apportare modifiche funzionali, mediante rimaneggiamento delle catene glicaniche, a proteine già presenti in circolo, piuttosto che sintetizzarne di nuove. Tali proteine, perdendo la capacità di svolgere la loro principale funzione, come nel caso di Hpt, ne acquistano di nuove ancora da scoprire.

Bibliografia

Arreduani M., Matthijs P., Van Hoeyveld E., Kasran A., Baumann H., Ceuppens JL, Stevens E.: "Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release". *Immunol.* **108**, 144-151 (2003).

Balestrieri M., Cigliano L., De Simone ML., Dale B., and Abrescia P.: "Haptoglobin inhibits Lecithin-Cholesterol Acyltransferase in human ovarian follicular fluid". *M. Reprod Dev.* **59**, 186-191 (2001).

Biesambaeva RU., Mursgalieva AT., Dzhumalieva LM., Shaikenov TE. and Mevkh AT.: "Identification of haptoglobin as an endogenous inhibitor of prostaglandin H synthase in the cytosol fraction of primary cells from sheep vwsicular glands". *FEBS Lett.* **269**, 125-127 (1990).

Black A. and Dixon GH.: "Amino-acid sequence of alpha chains of human haptoglobin". *Nature* **218**, 736-741 (1968).

Bowman BH. And Kurosky A.: "Haptoglobin the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation". *Adv Human Genet.* **12**, 189-261 (1982).

Cid MC., Grant DS., and Hoffman GS.: "Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemin vasculitis". *J.Clin Invest.* **91**, 977-985 (1993).

Cigliano L., Spagnuolo MS. and Abrescia P.: "Quantitative variations of the isoforms in haptoglobin 1-2 and 2-2 individual phenotypes". *Arch. Biochem. Biophys.* **416**, 227-237 (2003).

Collins BE. and Paulson JC. "Cell surface biology mediated by low affinity multivalent protein glycan interaction". *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 617-625 (2004).

Cyster LG., and Goodnow CC.: "Tuning antigen receptor signaling by CD22: integrating cues antigens and the microenvironment". *Immunity* **6**, 509-517 (1997).

De Kleijn DSPV., Smeets MB., Kemmeren PPCW.: "Acute-phase protein haptoglobin is a cell migration factor involved in arterial restructuring." *FASEB J* **16**, 1123-1125 (2002).

El Ghmati SM., Van Hoeyveld EM., Van Strijp JG., Ceuppens JL., and Stevens EA.: " Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18". *Immunol.* **156**, 2542-2553 (1996).

Engers R. and Gabbert HE.: "Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implication." *J. Cancer Res. Clin Oncol.* **126**, 682-691 (2000).

Ferens-Sieczkowska M., Midro A., Mierzejewska-Iwanowska B, Zwierz K., Katnik-Prastowska I.: "Haptoglobin glycoforms in a case of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome". *Glycoconj. J.*, **16**, 573-577 (1999).

Flukae K., Yamamoto N, Hatakeyama Y and Kajihara Y. "Chemoenzymatic synthesis of diverse asparagine-linked α -(2,3)-sialylogosaccharides". **21**, 243-250 (2004).

Fujimura T., Shinohara Y., Tissot B., Pang PC., Kurogochi M., Saito S., Arai Y., Sadiklek M., Murayama K., Dell A., Nishimura SI. And Hakomori. SI.: " Glycosylation status of haptoglobin in sera of patients with prostate cancer vs benign prostate disease or normal subjects". *Int.J.Cancer.* **122**, 39-49 (2008).

Gottlieb AB.: "Psoriasis: emerging therapeutic strategies". *Nature reviews.* **4**, 19-34 (2005).

Guo HB., Nairn A., Harrisk Randolph M., Alvarez-Manilla G., Moremen K., Pierce M.: "Loss expression of N-acetylglucosaminyl transferase Va results in altered gene expression of glycosyltransferases and galectins". *FEBS lett.* **582**, 527-535 (2008).

Hanasaky K.: Binding of human plasma sialoglycoproteins by the B cell-specific lectin CD22. Selective recognition of immunoglobulin M and Haptoglobin". *J.Biol.Chem.* **270**, 7543-7550 (1995).

Helenius A. and Aebi M.: "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum". *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 1019-1049 (2004).

Hennet T., Chui D., Paulson JC and Marth JD.: "Immune regulation by the ST6Gal silyltransferase". *Proc Natl Acad. Sci. USA.* **95**, 4504-4509 (1998).

Hughes GJ., Frutiger S., Paquet N., Ravier F., Pasquali c., Sanchez JC., James RW., Tissot JD., Bjellqvist B and Hochstrasser DF. : "Plasma protein map: an update by microsequencing". *Electrophoresis* **13**, 707-714 (1992).

Hwang HY., Olson SK., Esko JD. and Horvitz HR.: " Caenorabditis elegans early embryogenesis and vulval morphogenesis require chondroitin biosynthesis". *Nature* **423**,439-443 (2003).

Jue DM., Shim BS. And Kang YS.: "Inhibition of prostaglandin synthase activity of sheep seminal vesicular gland by human serum haptoglobin". *Moll. Cell. Biochem.* **51**, 141-147 (1983).

Kalmovarian N., Friedrichs WE., O'Brien HV.: "Extrahepatic expression of plasma protein genes during inflammation". *Inflammation* **15**, 369-379 (1991).

Kathy L. Sharpe-Timms, Ph.D and Steven L. Young, M.D., Ph.D.: "Understanding endometriosis is the key to successful therapeutic management". *Fertility and Sterility* **81**, 1201-1203 (2004).

Kurosky A., Hay RE., Kim HH., Touchstone B., Rasco MA. And Bowman BH.: "characterization of cyanogens bromide fragments of the β chain of human haptoglobin". *Biochem.* **15**, 5326-5336 (1976). Laemmli UK.: "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4". *Nature* **227**, 680-685 (1970).

Lowe JB and Marth JD.: "A genetic approach to mammalian glycan function". *Annual. Rev. Biochem.* **72**, 643-691 (2003).

Ludwing RJ., Herzog G., Rostock A., Ochsendorf FR., Zollmner TM., Thaci D., Kaufmann R., Vogl TJ., Bochncke WH.: "Psoriasis: a possible risk factor for development of coronary artery calcification". *Br. J. Dermat.* **156**, 271-276 (2007).

Mai Z. and Ajit V.: "Cell surface sialic acid do not affect primary CD22 interaction with CD45 and surface IgM noe the rate of constitutive CD22 andocytosis". *Glycobiol.* **14**, 939-949 (2004).

Mann Ac., Record CO., Self CH and Turner GA.: "Monosaccharide composition of Haptoglobin in liver disease and alcohol abuse: large changes in glycosylation associated with alcoholic liver disease". *Clin. Chim. Acta* **227**, 69-78 (1994).

Metodologia Biochimica a cura di Keith Wilson and John Walker Raffaello Cortina Editore 1995. Miller SI., Ernest RK. and Bader MW.: "LPS, TRL4 and infectius disease diversity". *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 36-46 (2005).

Mirjam BS, Joost PGS., Marjo MPC.D. Evelyn V., Sylvia H., Gerard P. and de Kleijn PVD.: "Oncreased arterial expression of a glycosylated Haptoglobin isoform after ballon dilation." *Card. Res.* **58**, 689-695 (2003).

Mirjam BS., Jolanda F., Annemike K., Gerard P. and de Kleijn.: "The acute phase protein Haptoglobin is loxically expressed in arthritic and oncological tissues". *Int. J. Exp. Patha.* **84**, 69-74 (2003).

Mohammad T., Goodarzi and Graham A. Turner.: "A lectin method for investigating the glycosylation of nanogram amounts of purified glycoprotein". *Glycoconj J.* **14**, 493-496 (1997).

Mulligan MS., Paulson JC., De Frees S., Zheng ZL., Lowe JB. and Ward PA.: "Protective effects of oligosaccharides in P-selectin-dependen lung injury". *Nature.***364**, 149-151 (1993).

Nakagawa K., Kitazume S., Oka R., Maruyama K., Saido TC., Sato Y., Endo T. and Hashimoto Y.: "Sialylation enhances the secretion of neurotoxic amyloid-beta peptides". *J. Neurochem.* **96**,924-933 (2006).

O'Farrell PH.: "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins". *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021 (1975).

Oh SK., Very DL., Walker J., Raam S and Ju ST.: "An analogy between fetal haptoglobin and a potent immunosuppressor in cancer." *Cancer Res.* **47**,5120-5126 (1975).

Okuyama N., Ide Y., Nakano M., Nakagawa T., Yamanaka k., Moriwaki K., Murata K., Ohigashi H., Yakoyama S., Eguchi H., Ishikawa O., Ito T., Kato M., Kasahara A., Kawano S., Gu J., Taniguchi N., Miyoshi E.: "Fucosylated Haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: a detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation". *International J. of Cancer.*

Piva M. and Sharpe-Timms KL.: "Peritoneal lesion differentially express a Haptoglobin-like gene". *Mol. Hum. Reprod.* **5**, 71-78 (1999).

Piva M., Moreno JI. and Kathy LST.: "Glycosylation and over-expression of endometriosis-associated peritoneal Haptoglobin". *Glycoconj. J.* **19**, 33-41 (2002).

Quaye IK., Brandful J., Ekuban FA Gyan B and Ankrah NA.: "Haptoglobin polymorphism in human immunodeficiency virus infection: Hp0 phenotype limits depletion of CD4 counts in HIV-1-seropositive individuals". *J. Infect. Dis.* **181**, 1843-1845 (2000).

Raman R., Raguram S., Venkataraman G., Paulson JC. and Sasisekharan R.: "Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationship of glycans". *Nature Methods.* **2**,817-824 (2005).

Rogers DP., Roberts LM., Lebowitz J., Datta G., Anantharamaiah GM., Engler LA and Brouillette CG.: "The lipid-free structure of apolipoprotein A-1: effects of amino-terminal deletions". *Biochem.* **37**,11714-11725 (1998).

Snellman O. and Sylvén B.: "Haptoglobin acting as a natural inhibitor of cathepsin B activity" *Nature* **216**, (1967).

Spagnuolo MS., Cigliano L., D'Andrea L., Pedone C. and Abrescia P.: "Assignment of the binding site for haptoglobin on apolipoprotein A-1". *J. Biol. Chem.* **280**, 1193-1198 (2005).

Stahn R. and Zeisig R.: "Cell adhesion inhibition by glycoliposomes: effects of vesicle diameter and ligand density". *Tumour Biol.* **21**,176-186 (2000).

Sunil KR., Bhawna G., Charu A., Ashish S., Rakha HD., Chaturvedi VP. And Hasi RD.: “ Altered expression and glycosilation of plasma proteins in rheumatoid arthritis.” *Glicoconj.J.* **23**, 167-173 (2006).

Turner GA, Goodarzi MT and Thomson S.: “Glycosylation of alpha-1proteinase inhibitor and Haptoglobin in ovarian cancer:evidence for two different mechanisms”. *Glycoconj. J.* **12**, 211-218 (1995).

Vakke M., Thio HB., Prens EP., Sijbrands EJ., Neumann HA.: “Unfavorable cardiovascular risk prfiles in untreated and treated psoriasis patients”. *Atherosclerosis.* **190**, 1-9 (2007).

VanDijk W, Havenaar EC. and Brinkman-van der Linder EC.: “Alpha 1-aid glycoprotein (orosomuroid): pathophysiological changes in glycosylation in relation to its function” *Glycoconj J.* **12**, 227-233 (1995).

Xie Y., Li Y., Zhang Q., Stiller MJ., Wang CL. And Streilein JW.: “Haptoglobin is a natural regulator of Langerhans cell function in the skin”. *J. Dermatol. Sci.* **24**, 25.37 (2000).

Yong PH., Junit SM., Fathima H. and Onn HH.: “Patients with congenital hypothyroidism demonstrate different altered expression of plasma fibrinogen and Haptoglobin polypeptide chains”. *Clin. Biochem.* **39**, 126-132 (2006).

Yoshiki Y., Mamiko N., Mayumi N., Hirokazu Y., Hiroaki S., Kazuhisa U., Kenya S. and Koichi K.: “Glycoform-dependent conformational alteration of Fc region of human immunoglobulin G1 as reveled by NMR spectroscopy”. *Biochem. Biophys Acta.* **1760**, 693-700 (2006).