



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

**Facoltà di Medicina e Chirurgia
Corso di Dottorato in Fisiopatologia Medica e Farmacologia**

**“GLI ISTONI DEIMINATI
COME TARGET DI AUTOANTICORPI
E LORO RUOLO NELLA PATOGENESI
DELL'ARTRITE REUMATOIDE”**

Il Tutor:
Prof.ssa Paola Migliorini

Il Candidato:
Dott.ssa Cristina Tommasi

CAPITOLO 1

Introduzione

L'artrite reumatoide

L'artrite reumatoide (AR) è una malattia infiammatoria cronica su base autoimmune caratterizzata da diverse manifestazioni sistemiche, anche se il quadro tipico è rappresentato da una sinovite persistente che interessa generalmente le articolazioni periferiche [A.A.V.V., 1999]. A livello articolare il processo è caratterizzato da una sinovite simmetrica ed erosiva responsabile della progressiva distruzione delle articolazioni, del dolore, della limitazione al movimento e della riduzione della qualità di vita.

L'AR è diffusa in tutto il mondo con picchi di maggiore frequenza nei paesi a clima temperato: ha una prevalenza dello 0,5-2% in Europa, Nord America, Asia e Sud Africa; raggiunge il 5% in alcune popolazioni del Nord America e lo 0,2% in Giappone e in alcune popolazioni rurali dell'Africa; è assente in Nigeria. In Italia colpisce circa l'1% della popolazione. L'incidenza annuale nelle donne è 0,02-0,05% e negli uomini è 0,01-0,02% (rapporto maschi/femmine circa 1:3), con un picco nella terza-quarta decade di vita; la prevalenza aumenta con l'età e le differenze fra i due sessi diminuiscono nella popolazione anziana [Cugini et Al., 2004].

L'AR ha un esordio assai variabile: nella maggioranza dei pazienti è insidioso, con sintomi prodromici aspecifici (senso di affaticamento, anoressia, debolezza generalizzata, interessamento muscolo-scheletrico) di durata variabile; solo in alcuni soggetti l'esordio è acuto, con rapida comparsa di poliartrite spesso associata a sintomi sistemici.

In alcuni casi, si ha un interessamento pauciarticolare, di modesta entità e di breve durata, con danno articolare minimo, mentre, in altri casi, si può avere una poliartrite progressiva senza fasi di remissione che esita nelle caratteristiche deformità articolari. In un terzo dei pazienti i sintomi possono limitarsi inizialmente a una o poche articolazioni e, anche se in alcuni pazienti il coinvolgimento articolare può rimanere asimmetrico, quello simmetrico è certamente più frequente.

L'AR si manifesta con dolore, aggravato dal movimento, a livello delle articolazioni coinvolte; tipica è la rigidità mattutina, perché è esacerbata da un periodo di inattività, di durata superiore a un'ora. L'infiammazione sinoviale determina tumefazione, dolorabilità e limitazione dei movimenti: il dolore deriva essenzialmente dalla capsula articolare, che essendo ampiamente innervata è sensibile allo stiramento e alla distensione; la tumefazione articolare deriva dall'accumulo di liquido sinoviale, dall'ipertrofia della sinovia e dall'ispessimento della capsula articolare. Con il passare del tempo, a causa dell'anchilosi fibrosa e ossea e delle contratture dei tessuti molli, compaiono le deformità stabili [A.A.V.V., 1999].

L'eziologia dell'AR è ancora sconosciuta: sembra chiaro però che l'eziologia della malattia sia mediata dall'interazione di due componenti: quella genetica e quella

ambientale. Si ritiene cioè che la patologia insorga in individui immuno-geneticamente suscettibili, quando uno o più fattori artritogenici (ancora sconosciuti) innescano i processi di autoimmunità: inizialmente si assiste a un processo infiammatorio acuto, il quale, automantenendosi, determina il carattere di cronicità della malattia [Cotran et Al., 1997].

La predisposizione genetica alla malattia è indicata da studi familiari: circa il 10% dei pazienti con AR ha un parente di primo grado colpito dalla malattia; i gemelli monozigoti hanno quattro volte la possibilità di essere concordanti per l'AR rispetto ai gemelli dizigoti, i quali presentano un rischio di sviluppare la malattia uguale a quello dei fratelli non gemelli [Dieude e Cornelis, 2005].

Anche se il numero dei geni che conferiscono suscettibilità alla malattia è elevato e in continua crescita è stato possibile individuare un'associazione fra la malattia e alcuni alleli del complesso HLA di classe II [Reviron et Al., 2001], in particolare con una sequenza condivisa da alcuni di questi alleli detta "shared epitope" [Gregersen et Al., 1987]. Le molecole HLA che contengono lo "shared epitope" sono il DR1 e il DR4. Anche altri alleli che portano tale sequenza condivisa possono essere associati con l'AR ma con una prevalenza inferiore. Gli alleli non associati con l'AR invece mostrano in tale regione una o più differenze, che consistono, in genere, in un aminoacido carico negativamente. Poiché tutti gli alleli associati con l'AR condividono lo "shared epitope" ma differiscono nelle altre regioni della molecola, è chiaro che lo "shared epitope" è appunto il principale determinante della predisposizione a sviluppare la malattia. È tuttavia importante sottolineare che, benché nei pazienti con AR la frequenza degli alleli predisponenti sia alta, questi sono presenti anche nella popolazione non affetta dalla malattia.

Non è possibile spiegare l'incidenza dell'AR solo sulla base di fattori genetici di rischio e si pensa che anche fattori ambientali (per esempio il fumo di sigaretta) possano avere un ruolo eziologico nella malattia.

Una delle ipotesi più accreditate è il possibile coinvolgimento di un agente batterico o virale, il quale, infettando un individuo geneticamente predisposto, costituirebbe l'evento scatenante dell'AR [A.A.V.V., 2001].

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è fortemente sospettato [Roudier et Al., 1989], insieme a retrovirus, micobatteri, *Borrelia*, *Mycoplasmi* e molti altri. L'ipotesi di un coinvolgimento dell'EBV appare particolarmente solida: l'80% dei pazienti con AR ha anticorpi diretti contro antigeni specifici dell'EBV e il 90% ha anticorpi anti *rheumatoid arthritis nuclear antigens* (anti-RANA), rivolti cioè contro costituenti antigenici nucleari estratti da cellule linfoblastoidi infettate da EBV (che compaiono solo nel 15% dei soggetti sani o affetti da altre artropatie). Il titolo degli anticorpi anti-EBV è però basso nelle prime fasi di malattia, per cui potrebbe trattarsi di un fenomeno secondario alla malattia stessa [Maini e Zvaifler, 1994].

Infine, da menzionare anche il possibile contributo di fattori ormonali nel conferire un aumentato rischio di sviluppare la malattia: l'AR colpisce il sesso femminile in misura significativamente superiore rispetto a quello maschile e il picco di incidenza della malattia nelle donne si trova nel periodo premenopausale. Gli interessi degli

studi epidemiologici si sono concentrati sull'influenza della parità, dell'allattamento al seno, dei livelli di ormoni sessuali endogeni e dell'utilizzo di ormoni sessuali esogeni nel determinare suscettibilità [Maini e Zvaifler, 1994], ma allo stato attuale emergono risultati in conflitto tra loro.

La sinovite reumatoide è caratterizzata da una massiva infiltrazione della sinovia da parte di varie cellule immunitarie effettrici (principalmente linfociti T e B, neutrofilii, monociti). Queste cellule possono proliferare e produrre citochine e chemochine infiammatorie. Inoltre, anche grazie al vascular growth factor, che promuove la neovascolarizzazione e la permeabilità vascolare, e facilita la migrazione cellulare, altre cellule effettrici sono reclutate nell'articolazione. Nel tempo questo processo crea un milieu di citochine attivanti i fibroblasti e gli osteoclasti della sinovia, che degradano la cartilagine e l'osso.

Le cellule T effettrici sono probabilmente le prime a riconoscere un autoantigene come estraneo, venendo così attivate e fornendo l'aiuto necessario alle cellule B per produrre anticorpi. In seguito all'attivazione, queste cellule effettrici proliferano e producono citochine proinfiammatorie, portando avanti una risposta immune.

Dall'altra parte troviamo le cellule T regolatorie (cellule Treg) che sembrano incapaci di controllare questa risposta immune autoreattiva. Non è ancora chiaro se queste cellule Treg siano funzionalmente deficienti, ma i dati indicano che il $TNF\alpha$ è probabilmente coinvolto nella down-regolazione della funzione dei Treg [Ehrenstein et Al., 2004]. Infatti le cellule Treg dei pazienti con AR non sopprimono la produzione di citochine da parte delle cellule T effettrici [van Amelsfort et Al., 2004]. Per molti anni l'artrite reumatoide è stata considerata una malattia autoimmune principalmente mediata dai linfociti T helper 1 (Th1). L'abbondanza delle citochine Th1, specialmente $IFN\gamma$, e la relativa mancanza di citochine T helper 2 (Th2) come l'IL4, l'IL5 e l'IL10, nei pazienti AR favorisce questa ipotesi. L'abilità dei Th1 di attivare i monociti, principale sorgente di $TNF\alpha$ nell'AR, è un ulteriore argomento a favore di questa ipotesi. Oggi sappiamo che anche altre cellule T hanno un ruolo nell'artrite reumatoide: varie osservazioni hanno messo in evidenza un possibile ruolo svolto dai linfociti T helper 17 (Th17) nella patogenesi di AR [Murphy et Al., 2003].

La presenza di FR e ACPA diversi anni prima dell'esordio clinico della malattia implica un coinvolgimento precoce di cellule B specifiche per certi auto antigeni: si ha attivazione delle cellule B e differenziazione a plasmacellule. Il ruolo delle cellule B nell'artrite reumatoide è multifattoriale: include la produzione di citochine ($TNF\alpha$, IL6, IL10), la presentazione dell'antigene, la modulazione della risposta T dipendente e la produzione di autoanticorpi [Dorner, 2006]. Inoltre le cellule B sono stimulate da meccanismi attivatori dell'immunità innata, come per esempio gli immunocomplessi e il DNA batterico, unendo così risposte immuni specifiche e non specifiche. Le cellule B, producendo $TNF\alpha$, IL6 e IL10, contribuiscono all'attivazione dei macrofagi e partecipano direttamente all'infiammazione. L'IL6 è anche un importante fattore di differenziamento per le cellule B stesse. I linfociti B che producono IL10 sono stati implicati nell'inibizione della risposta immune, inducendo tolleranza nelle cellule T,

ma il loro esatto fenotipo e il loro ruolo nell'AR è meno conosciuto.

Durante l'inflammation le cellule B infiltrano la sinovia: il grado di infiltrazione e di organizzazione strutturale locale varia significativamente tra i pazienti. I sinoviociti e le cellule dendritiche della sinovia secernono fattori che attraggono i linfociti B e influenzano il loro differenziamento e la loro sopravvivenza (BAFF, CXCL12, CXCL13, APRIL). Alcuni di questi fattori sono correntemente valutati come target terapeutici. In alcuni pazienti si osserva, a livello sinoviale, la formazione delle strutture linfoidi terziarie: sono formate principalmente da linfociti B e T e da cellule dendritiche follicolari. Localmente, l'interazione delle cellule B e T è importante per l'adeguata funzione di entrambi i tipi cellulari dato che ognuna fornisce aiuto all'altra.

L'attivazione delle cellule T da parte di cellule B è stata dimostrata essere di primaria importanza in un modello di artrite murino, benché il relativo contributo di questo meccanismo nell'uomo sia meno chiaro.

D'altro canto, le cellule T attivano le B a produrre anticorpi. Lo switching di classe immunoglobulinica e l'ipermutazione somatica dipendono normalmente dalla presenza di cellule T e richiedono l'interazione CD40-CD40L. Recenti scoperte, tuttavia, indicano che lo switching di classe immunoglobulinica nelle cellule B può anche avvenire indipendentemente dalle cellule T: questo processo richiede BAFF che è presente in elevate quantità nella sinovia di AR [Dorner, 2006; Mauri e Ehrenstein, 2007].

Un altro importante aspetto delle cellule B è l'espressione di diversi recettori Toll-like (TLR) che forniscono un importante legame tra immunità innata e adattativa. I TLR sono stimolati preferenzialmente da segnali di pericolo: TLR9 per esempio rileva DNA microbico con motivi CpG ipometilati. In modelli murini di AR, complessi immuni contenenti IgG legate a cromatina di mammifero attivano cellule B impegnando sequenzialmente i recettori delle cellule B e i TLR9 [Leadbetter et Al., 2002]. Un meccanismo simile si verifica per gli antigeni associati con RNA a singolo filamento impegnando BCR e TLR-7 [Lau et Al., 2005]. Queste scoperte sono importanti poiché DNA mitocondriale ipometilato, rilasciato da cellule morte, è abbondantemente presente nella sinovia di AR. L'attivazione di TLR-9 attiva la trascrizione di geni della linea germinale coinvolti nello switch di classe immunoglobulinica, benché la conseguente produzione di IgG richieda segnale BCR e presenza di BAFF [He et Al., 2004]. Questo indica che composti non proteici contenuti nel liquido sinoviale sono intimamente coinvolti nell'attivazione dei linfociti B potenzialmente autoreattivi, guidando così la produzione di anticorpi e la formazione di immunocomplessi.

Il ruolo degli autoanticorpi nell'AR non è ancora completamente chiaro. Gli ACPA sono molto probabilmente direttamente coinvolti nella patogenesi dell'AR positiva per l'epitopo condiviso, benché l'esatto meccanismo rimanga sconosciuto.

Anche il FR è associato con severità e progressione di malattia, ma poiché ha minore specificità per l'AR, si ritiene che sia coinvolto nell'inflammation piuttosto che nell'innescamento della malattia: il FR forma immunocomplessi che inducono danno tissutale, attivano efficientemente il complemento, reclutano macrofagi e inducono secrezione di citochine infiammatorie [Dorner et Al., 2004].

Autoanticorpi nell'artrite reumatoide

Nel siero dei pazienti affetti da AR si trovano molti anticorpi diretti verso proteine self. Molti di questi autoanticorpi, tuttavia, possono essere presenti in pazienti con altri disordini del sistema immunitario e quindi non sono specifici per l'AR. Il fattore reumatoide (FR), uno degli autoanticorpi più conosciuti [Carson et Al., 1987], è diretto contro la regione costante (Fc) delle immunoglobuline di classe IgG, si ritrova nel 50-70% dei soggetti con AR, ha valore prognostico sfavorevole (correla con la severità della malattia), ma non è specifico: è presente in altre malattie autoimmuni come lupus eritematoso sistemico (LES), sclerosi sistemica (SSc), connettivite mista (MCTD), sindrome di Sjogren (SS), nelle infezioni virali (es. HIV, epatiti, EBV), nelle infestazioni parassitarie (es. malaria), nelle infezioni batteriche (es. tubercolosi, brucellosi) e nel 3-5% della popolazione normale (10-30% dei soggetti in età avanzata). Il FR, inoltre, è frequentemente assente all'esordio dell'AR, quando la diagnosi differenziale da altre forme artritiche è più difficile.

La presenza del FR non è perciò sufficiente per effettuare diagnosi di AR, dato che il valore predittivo della sua presenza per la diagnosi di AR è scarso, mentre può essere importante per la prognosi dei pazienti, dato che la presenza di elevati livelli di FR si associa alle forme più gravi di malattia.

L'identificazione e la caratterizzazione del FR quale autoanticorpo è stata la prima prova diretta che l'autoimmunità gioca un ruolo importante nell'AR. Il FR che si trova nel siero dei pazienti con AR ha caratteristiche distintive: è ad alta affinità e specifico per le IgG umane (nelle altre malattie ha bassa affinità ed è polispecifico) [A.A.V.V., 2001]. Il FR può essere un'immunoglobulina di classe IgM (il più frequente), IgG o IgA, e riconosce diversi epitopi localizzati sulla parte CH2 e CH3 della porzione FC delle IgG. I test convalidati e standardizzati che si trovano in commercio permettono di determinare tutti e tre i tipi di FR, anche se il FR IgM è il più importante dal punto di vista diagnostico [Ulvestad et Al., 2001]. Le tecniche maggiormente utilizzate per la ricerca del FR sono: il RA test (Rheumatoid Arthritis Test) che utilizza particelle in lattice ricoperte da IgG umane; la reazione di Waaler-Rose, nella quale vengono utilizzate emazie di montone e un siero di coniglio immunizzato con tali emazie; un test ELISA, basato sull'immobilizzazione su micropiastre di immunoglobuline di coniglio. Nel siero di pazienti con AR possiamo trovare anche altri autoanticorpi: anti-RA33 (anti-hnRNP-A2), anticalpastatina (un inibitore della proteasi neutra calcio-dipendente calpaina), ANCA (anticorpi anticitoplasma dei neutrofili), ANA (anticorpi antinucleari), antifibronectina, anticollagene tipo II e antiGPI (glucosio-6-fosfato isomerasi) [van Venrooij et Al., 2004; Vossenaar e van Venrooij, 2004]. Molti di questi autoanticorpi sono presenti anche in altre malattie immunitarie come LES e MCTD, ma anche in individui sani.

Autoanticorpi diretti verso BiP, conosciuti come anti-p68, sono presenti nel 64% dei pazienti con AR e sono altamente specifici per l'AR [Blass et Al., 1995]. BiP è una heat-shock protein, che normalmente è espressa nel reticolo endoplasmatico. In condizioni di stress, come nel tessuto sinoviale reumatoide, BiP viene sovraespressa e traslocata parzialmente sulla membrana cellulare [Blass et Al., 2001]. I maggiori epitopi per gli

anti-BiP sono i gruppi di N-acetil-glucosammina che normalmente non sono presenti su BiP ma che vengono espressi durante la traslocazione. L'antigene BiP potrebbe essere un target per la risposta immune delle cellule T nell'AR. Non esistono dati sul valore predittivo della presenza di tale anticorpi.

Gli anticorpi anti-Sa sono altamente specifici per l'AR (92-99%), ma la loro sensibilità è moderata (30-40%) [Despres et Al., 1994]. Originariamente l'antigene Sa fu descritto come una proteina del peso di 50 e 55 KDa che era riconosciuta dai sieri di pazienti AR su immunoblot contenenti estratti di milza e placenta di individui sani: l'antigene Sa non è altro che la forma citrullinata della vimentina [Vossenaar et Al., 2004 (a)].

Un marker molto specifico di malattia emerso recentemente è rappresentato dagli anticorpi anti-peptidi citrullinati: la loro presenza è un importante criterio sia per la diagnosi di malattia che per la sua prognosi [Pruijin et Al., 2010]. A questa famiglia appartengono quegli anticorpi che negli anni 70-90 venivano definiti APF (anti-Fattore Perinucleare) e AKA (anti-cheratina).

Nel 1964 Nienhuis e Mandema [Nienhuis e Mandema, 1964] hanno scoperto degli autoanticorpi specifici per l'AR (si trovano nei 2/3 dei pazienti affetti da AR): gli anticorpi anti-fattore perinucleare (anti perinuclear factor o APF) [Hoet e van Venrooij, 1992]. Gli APF vengono evidenziati con l'immunofluorescenza indiretta usando cellule di mucosa buccale umana come substrato antigenico [Vincent et Al., 1999]. In seguito è stato scoperto che il fattore perinucleare è localizzato nei granuli cheratoialini del citoplasma delle cellule epiteliali [Hoet et Al., 1991 (a)]. Gli APF vengono prodotti in circa il 20% dei pazienti con AR, sono presenti nelle fasi iniziali della malattia, anche prima delle manifestazioni cliniche, potrebbero quindi essere utili per una diagnosi precoce. Tuttavia non sono mai stati utilizzati nella diagnostica per alcune difficoltà tecniche: il numero e il livello di reattività dei granuli perinucleari dipende dal donatore (il laboratorio deve identificare il migliore tra vari donatori), la standardizzazione del test è difficile e la riproducibilità dei risultati è scarsa.

Nel 1979 Young e collaboratori [Young et Al., 1979] hanno descritto degli anticorpi evidenziabili con l'immunofluorescenza indiretta usando epitelio di esofago di ratto: poiché le citocheratine sono le proteine più abbondanti dello strato corneo, questi anticorpi furono chiamati anticorpi anti-cheratina (AKA) in assenza di altre evidenze biochimiche. Come gli APF, gli AKA sono altamente specifici (99%) [Vincent et Al., 1989] e si ritrovano in fase preclinica nei pazienti con AR.

Sebbene gli antigeni target non fossero stati identificati, numerosi studi dimostrarono l'utilità della ricerca di APF e AKA nella diagnosi dell'AR [Youinou e Serre, 1995]: nonostante la loro inferiore sensibilità diagnostica rispetto al fattore reumatoide, la loro specificità per l'AR era veramente elevata, raggiungendo il 99% con gli AKA [Vincent et Al., 1989]. Poiché questi anticorpi appaiono precocemente nel corso della malattia, anche prima della diagnosi clinica [Aho et Al., 1993], la determinazione di questi anticorpi poteva aiutare a identificare i soggetti con AR, permettendo di iniziare precocemente il trattamento. Alcuni gruppi riportarono che la presenza e il titolo di APF e AKA erano anche legati alla prognosi della malattia e questi risultati sono stati confermati da studi prospettici [Mallya et Al., 1983; Meyer et Al., 1986; Paimela et Al.,

1992; Forslin et Al., 2001].

Nel 1993 Simone e collaboratori [Simon et Al., 1993] hanno individuato il target degli AKA nella (pro)filaggrina (una proteina filamentosa aggregante i filamenti di citocheratina che si trova nelle cellule epiteliali umane) e nel 1995 Sebbag e collaboratori [Sebbag et Al., 1995] hanno dimostrato l'esistenza di una parziale sovrapposizione fra APF e AKA: entrambi vengono identificati come AFA (anti filaggrin antibodies).

La filaggrina si lega ai filamenti di cheratina formando una struttura citoscheletrica rigida. E' sintetizzata dalle cellule epiteliali come un grosso precursore altamente fosforilato, la profilaggrina, che contiene una ripetizione di 10-12 molecole di filaggrina. Durante l'ultimo stadio del differenziamento, la profilaggrina va incontro a modificazioni post-traduzionali: viene defosforilata e il 20% dei residui di arginina vengono convertiti in citrullina dall'enzima peptidil arginina deiminasi (PAD). Nel processo di deiminazione il gruppo aminico del residuo di arginina viene convertito nel gruppo ureidico della citrullina. Questa conversione porta a un piccolo cambiamento nella struttura molecolare e alla perdita di una carica positiva: si ha quindi un decremento della carica netta positiva della proteina e una diversa abilità di interagire con altre proteine [Tarsca et Al., 1996]. Inoltre con la deiminazione la filaggrina acquisisce una struttura più aperta e diventa più accessibile a enzimi proteolitici, come la calpaina, una proteasi neutra calcio dipendente, che opera la scissione proteolitica della profilaggrina in unità più piccole [Pearson et Al., 2002]. Le subunità "mature" di filaggrina legano i filamenti di cheratina formando una densa macrofibrilla che protegge la cheratina dalla degradazione proteolitica [Manabe et Al., 1991]. Gli AFA non legano il precursore profilaggrina (la molecola non deiminata), ma reagiscono esclusivamente con la filaggrina deiminata in vivo o in vitro [Girbal-Neuhauser et Al., 1999]: i residui di citrullina rappresentano un costituente essenziale degli epitopi riconosciuti da questi anticorpi.

Poiché i test diagnostici nei quali venivano ricercati gli APF e gli AKA erano tecnicamente difficoltosi e non facilmente standardizzabili sono stati sviluppati saggi in cui la filaggrina viene utilizzata come substrato antigenico: immunoblotting [Vincent et Al., 1989], ELISA [Palosuo et Al., 1998; Nogueira et Al., 2001], test LIA (line immunoassay) [Union et Al., 2002].

Schellekens e collaboratori hanno identificato nella filaggrina alcune sequenze contenenti molte arginine che hanno un alto indice di antigenicità [Schellekens et Al., 1998]: queste sequenze sono state sintetizzate sostituendo le arginine con le citrulline. Gli AFA sono in grado di reagire con queste sequenze sintetiche e in generale la presenza di un numero crescente di citrulline incrementa l'antigenicità.

Un ulteriore progresso è stato ottenuto sintetizzando un peptide ciclico citrullinato (CCP) che meglio espone i residui di citrullina. Il CCP è stato testato in ELISA e ha dimostrato una sensibilità del 68% e una specificità del 98% [Schellekens et Al., 2000]. Questi anticorpi sono predittivi dello sviluppo dell'AR nei pazienti con artrite indifferenziata e sono associati con la gravità della distruzione articolare [Van Gaalen et Al., 2004]. Sono oggi disponibili diversi kit commerciali e quelli di seconda generazione contengono vari peptidi citrullinati sintetici che aumentano la sensibilità diagnostica

del test [van Venrooij et Al., 2004]. Gli anti-CCP sono altamente specifici per l'AR. Nel 2007 sono stati infine inseriti dalla European League against Rheumatism nelle nuove linee guida per una diagnosi precoce di AR [Walther et Al., 2008].

Diversi studi fanno pensare a un diretto coinvolgimento degli AFA nella patogenesi dell'AR: sono strettamente associati con la malattia, compaiono in fase preclinica [Kurki et Al., 1992; Paimela et Al., 1992], la loro presenza e il loro titolo correlano con l'attività e la severità della malattia [Quismorio et Al., 1983; Vincent et Al., 1989; Youinou e Serre, 1995; Meyer et Al., 1997]. Questi anticorpi sono inoltre prodotti localmente nella sinovia dei pazienti con AR [Ishida-Yamamoto et Al., 1997; Masson-Bessière et Al., 2000], suggerendo che la presenza di proteine citrullinate a livello sinoviale causi la maturazione antigene-dipendente di cellule B specifiche nel sito dell'infiammazione dell'AR.

La filaggrina tuttavia non è espressa a livello sinoviale, ma soltanto durante il differenziamento delle cellule epiteliali [Ishida-Yamamoto et Al., 1997] e l'epitelio non è considerato un bersaglio della risposta autoimmune nell'AR. Sembra che gli AFA siano originati da una risposta nei confronti di una o più proteine citrullinate presenti a livello sinoviale e che la loro reattività nei confronti della filaggrina citrullinata sia causata da cross-reattività.

La filaggrina è una proteina eterogenea: esiste infatti una considerevole variazione di sequenza nelle diverse subunità, a cui si aggiunge il diverso grado di fosforilazione e citrullinazione che contribuiscono ad aumentare la complessità della molecola. Gli AFA reagiscono sia con la filaggrina deiminata *in vitro* che con peptidi sintetici corrispondenti alla sequenza della filaggrina nei quali l'arginina è stata sostituita da citrullina.

Nel 2001 Masson-Bessiere e collaboratori [Masson-Bessiere et Al., 2001] hanno dimostrato un'ampia sovrapposizione fra AFA e anticorpi diretti contro il fibrinogeno deiminato, suggerendo che la forma deiminata della fibrina, depositata nella sinovia, possa essere un target per gli AFA. È stato anche dimostrato che l'antigene Sa, riconosciuto da anticorpi specifici presenti nel 50% dei pazienti con AR, si identifica con la vimentina deiminata [Despres et Al., 1994; Vossenaar et Al., 2004 (a)]. Così gli anticorpi specifici per l'artrite reumatoide riconoscono diverse proteine deimate e rappresentano una famiglia di anticorpi con specificità sovrapposte che possono essere collettivamente chiamati anticorpi anti-proteine/peptidi citrullinati (ACPA) [Vincent et Al., 2005].

I sieri AR mostrano un diverso grado di reattività verso differenti peptidi contenenti citrullina, suggerendo che siano importanti nel conferire antigenicità all'epitopo anche altri amminoacidi che fiancheggiano i residui di citrullina e che la risposta immune contro queste sequenze sia fortemente policlonale [Masson-Bessière et Al., 2000].

Molti studi hanno dimostrato che i sieri dei pazienti con AR contengono anticorpi che riconoscono anche altre proteine citrullinate tra le quali il collagene II (CII) [Burkhardt et Al., 2005], la fibrina/fibrinogeno [Masson-Bessiere et Al., 2001], la fibronectina [Chang et Al., 2005], la vimentina (antigene target degli anticorpi anti-Sa) [Vossenaar et Al., 2004 (a)], l' α -enolasi [Kinloch et Al., 2005], l'EBNA 1 (antigene nucleare

dell'*Epstein-Barr Virus*) [Anzilotti et Al., 2006] e peptidi da esso derivati (VCP-1 [Pratesi et Al., 2006] e VCP-2 [Pratesi et Al., 2011]).

La peptidil arginin deiminasi

La citrullina non è un aminoacido normalmente codificato, ma una forma deiminata della arginina: l'enzima che catalizza tale reazione è la peptidil arginina deiminasi (PAD) [Vossenaar et Al., 2003].

La PAD è un enzima calcio-dipendente che è inattivo alle normali concentrazioni intracellulari (10^{-7}) di calcio, ma in situazioni che aumentano la concentrazione di calcio fino al livello soglia (10^{-5}) come l'apoptosi, lo stress ossidativo o trattamenti in vitro con calcio ionoforo, viene attivato [Masson-Bessiere et Al., 2000]. La cinetica di legame del calcio nella PAD II mostra che tre molecole di calcio si possono legare per ciascuna molecola di PAD e che questi tre siti legano il calcio a bassa affinità (149L). Sono stati identificati cinque isotipi di PAD, clonati da vari mammiferi compreso l'uomo [Vossenaar et Al., 2003]. I diversi isotipi di PAD, che presentano estese omologie di sequenza, differiscono per la specifica distribuzione tissutale.

La PAD I è espressa nell'epidermide e nell'utero, i suoi substrati sono la cheratina e la filaggrina [Guerrin et Al., 2003].

La PAD II è espressa ubiquitariamente, in particolare nel sistema muscolo scheletrico [Watanabe e Senshu, 1989], nel SNC [Akiyama et Al., 1999], nella milza, nelle ghiandole sudoripare: agisce sulla proteina basica della mielina nel SNC e sulla vimentina nel muscolo scheletrico e nella milza.

La PAD III è espressa soprattutto negli strati superficiali dell'epidermide [Kanno et Al., 2000] e nei follicoli piliferi dove agisce sulla tricoialina.

La PAD IV è espressa maggiormente nei leucociti del sangue (granulociti e monociti) [Asaga et Al., 2001; Vossenaar et Al., 2004 (b)] ma si trova anche in altri tessuti [Chang et Al., 2005]. È l'unica che può trovarsi anche a livello nucleare: ha un dominio NLS nella parte amino terminale che è essenziale per la traslocazione attraverso la membrana nucleare [Nakashima et Al., 2002]: i suoi bersagli sono le proteine istoniche e la nucleofosmina/B23, entrambe presenti nel nucleo.

Per quanto riguarda la PAD VI non ci sono dati sull'espressione nei tessuti umani, ma l'mRNA di questo enzima è presente nell'ovaio, nel testicolo e nei leucociti circolanti [Zhang et Al., 2004].

I geni delle cinque isoforme PAD sono tutti localizzati in stretta prossimità sul braccio corto del cromosoma 1. L'alto grado d'omologia di sequenza delle isoforme, la struttura esonica altamente conservata, il mantenimento del cluster genico indicano che le cinque isoforme di PAD sono il risultato di una serie di duplicazioni geniche che hanno avuto luogo prima della divergenza genica [Guerrin et Al., 2003]. Non si conosce molto per quanto concerne la specificità della PAD per i substrati: la PAD non può convertire residui amminoacidici liberi, ma solo residui proteici. Tutte le diverse isoforme sono in grado di citrullinare proteine nelle quali l'arginina sia accessibile per la reazione in vitro [Senshu et Al., 1999]. Altri studi evidenziano come anche gli amminoacidi vicini influenzino la reazione [Nomura, 1992]. In vivo si pensa che sia importante, per la

selezione del substrato, la localizzazione intracellulare dell'enzima, il microambiente (dove la concentrazione di calcio risulta essere fondamentale) e le caratteristiche fisicochimiche della proteina target (come la struttura, la carica, la flessibilità).

Il preciso ruolo fisiologico delle citrulline nei peptidi non è chiaro [Hershko e Ciechanover, 1998; van Stipdonk et Al., 1998; Piacentini e Colizzi, 1999; Rathmell e Thompson, 1999]: si ha un cambiamento di carica e della struttura molecolare della proteina, che ne modifica la capacità di interagire con le proteine vicine, l'antigenicità e la funzione proteica [Tarcsa et Al., 1996]. La reazione di deiminazione porta ad una alterazione di massa di 1 Da per ogni arginina modificata. La perdita di cariche basiche influenza la carica complessiva, la distribuzione di carica, il punto isoelettrico, e quindi le capacità della proteina di formare legami ionici e legami ad idrogeno. Analisi in vitro hanno rivelato che un elevato grado di citrullinazione potrebbe denaturare le proteine: il processo di deiminazione potrebbe cambiare le strutture primarie, secondarie e terziarie delle proteine.

Alcuni eventi biologici come la differenziazione terminale nelle cellule epiteliali, l'infiammazione, l'apoptosi, i traumi, l'invecchiamento e l'espressione genica regolata dagli istoni, sembrano essere associate con la citrullinazione post-traduzionale [Cuthbert et Al., 2004; Wang et Al., 2004].

Sono stati condotti diversi studi sulla possibile associazione tra polimorfismi nucleotidici singoli sulla sequenza del gene della PAD IV e la suscettibilità all'insorgenza dell'AR. Negli studi svolti sulla popolazione giapponese [Suzuki et Al., 2003; Kuwahara et Al., 2004] e coreana [Ikari et Al., 2005] sono stati messi in evidenza 17 polimorfismi nucleotidici singoli sul gene della PAD IV, alcuni dei quali sono più frequenti. Alcuni polimorfismi definiscono un aplotipo che è più frequente nei soggetti con AR rispetto ai soggetti sani. La suscettibilità potrebbe essere spiegata dal fatto che tale aplotipo determina una maggiore stabilità dell'mRNA della PAD: il tempo di vita medio dell'mRNA dell'aplotipo 2 è 11.6 minuti, quello dell'aplotipo 1, che non conferisce suscettibilità, è di solo 2.1 minuti; questo potrebbe portare a un maggior numero di molecole tradotte dell'enzima che danno luogo a una maggiore quantità di proteine target deimate che a loro volta possono indurre una risposta immunitaria innata e adattativa responsabile dell'infiammazione cronica. Questo tipo di studio genetico è stato svolto anche sulla popolazione caucasica [Barton et Al., 2004], francese [Caponi et Al., 2005] spagnola e inglese, ma il risultato non è stato il medesimo: in queste popolazioni non è stato evidenziato un aplotipo caratteristico e più frequente in soggetti con AR rispetto ai soggetti normali. Tale risultato può essere legato a diversità genetiche esistenti tra le diverse popolazioni.

Studi di immunoistochimica effettuati sui lavaggi broncoalveolari e su biopsie bronchiali di soggetti fumatori e non fumatori hanno dimostrato un livello di espressione di PAD2 e una quantità di proteine citrullinate maggiore nei polmoni dei fumatori che in quelli dei non fumatori [Makrigiannakis et Al., 2008]. Ciò suggerisce che la PAD2 sia attivata da componenti presenti nel fumo o la cui liberazione è indotta dal fumo. In questo effetto può risiedere l'associazione del fumo con l'insorgenza di AR e con la presenza di ACPA.

Gli studi volti all'identificazione dell'isotipo di PAD espresso nel tessuto sinoviale infiammato dei pazienti con AR hanno rivelato una preponderanza di PAD2 e PAD4 [Anzilotti et Al., 2010].

Come ho già detto la PAD necessita di una concentrazione relativamente alta di calcio per essere attivata (10^{-5} M o più), e tali concentrazioni normalmente non sono presenti nelle cellule. Infatti la citrullinazione avviene tipicamente nelle cellule che stanno andando incontro a morte, quando la membrana cellulare permette il trasferimento di ingenti quantità di calcio extracellulare all'interno della cellula o il calcio viene liberato dai depositi intracellulari. Tale modificazione è infatti implicata in diversi processi fisiologici, come gli ultimi stadi della differenziazione dell'epidermide e l'apoptosi. Infatti, le PAD sono principalmente coinvolte in eventi apoptotici e di differenziazione pur essendo implicate anche in altri processi cellulari, come la regolazione dei geni. Anche l'infiammazione è uno dei momenti in cui, sia in modelli animali, sia nella sinovia dei pazienti affetti da AR, è possibile ritrovare proteine citrullinate [Cantaert et Al., 2006]. Da notare è però il fatto che normalmente il sistema immunitario non entra in contatto con tali proteine, che rimangono confinate all'interno delle cellule apoptotiche prima che le cellule stesse vengano fagocitate dai macrofagi; ma quando invece i meccanismi di clearance diventano inefficienti a causa, per esempio, di una massiva morte cellulare, le PAD e le proteine citrullinate possono uscire dalle cellule e "incontrare" il sistema immunitario. Comunque la presenza delle sole proteine citrullinate non conduce di per sé alla generazione di ACPA, ma tale produzione anticorpale sembra essere strettamente dipendente dal background genetico del paziente, avviene cioè solo nei soggetti che possiedono alleli HLA II recanti lo "shared epitope" [Balsa et Al., 2010]. E' stato visto inoltre che tali alleli non solo sono associati con la produzione di ACPA, ma che rendono la produzione anticorpale degli ACPA altamente specifica [Sebbag et Al., 2004].

Le proteine che vengono deiminate in condizioni fisiologiche sono:

- La *citocheratina*: le isoforme soprabasali K1 e K10 sono delle proteine deimate che si ritrovano nell'epidermide. La citocheratina è un filamento intermedio prodotto dai cheratinociti che determina la consistenza della pelle, dei capelli e delle unghie. Durante il processo di differenziazione dei cheratinociti l'ambiente intracellulare è esposto ad aumentate concentrazioni di calcio che gradualmente attivano PAD1, 2 e 3 e portano alla deimazione di questa proteina [Tarcsa et Al., 1996].
- La *tricoialina* (THH): è la proteina principale dei granuli di tricoialina, presenti nello strato granuloso dell'epidermide e di altri tessuti specializzati quali il palato duro e le rilevance filiformi della lingua. È una proteina della matrice interfilamentosa substrato delle transglutaminasi che svolge un ruolo di rinforzo dell'involucro corneo: coordina i legami tra i filamenti intermedi e l'involucro corneo. Durante la differenziazione, l'aumento della concentrazione di Ca^{2+} attiva la PAD3 e la THH viene citrullinata. Di conseguenza, la THH, perde la struttura ad α -elica e forma una struttura più aperta: in questo modo THH diventa solubile e diventa un substrato per la transglutaminasi.

- La *flaggrina*: è sintetizzata come una grande molecola, chiamata profilaggrina, e viene stoccata nelle cellule in uno stato altamente fosforilato. Durante la differenziazione terminale dei cheratinociti si verificano diverse modifiche postsintetiche: la profilaggrina è citrullinata, defosforilata e poi scissa in unità di filaggrina. La filaggrina allinea i filamenti intermedi di cheratina, controlla il cambiamento morfologico delle cellule e mantiene idratata l'epidermide.
- La *vimentina*: è un filamento intermedio espresso da varie cellule; a differenza dei microfilamenti di actina e dei microtubuli, i filamenti intermedi formano una rete molecolare molto stabile, meno dinamica. La regolazione dei processi di polimerizzazione e di depolimerizzazione non è stato ancora chiarita: tra i meccanismi candidati sono compresi la fosforilazione/defosforilazione e la citrullinazione. La fosforilazione e la deiminazione riducono il punto isoelettrico del dominio terminale amminico della vimentina che o perde la sua capacità di polimerizzare (vimentina solubile), o va incontro a depolimerizzazione (vimentina filamentosa) [Asaga et Al., 1998; Inagaki et Al., 1989]. Questo significa che le arginine sono essenziali per garantire la capacità della vimentina di formare filamenti. Durante l'apoptosi, quando la concentrazione di calcio intracellulare è molto alta, l'attivazione della PAD porta alla perdita completa dei filamenti intermedi di vimentina: questo meccanismo potrebbe svolgere un ruolo nei cambiamenti morfologici associati con l'apoptosi [Inagaki et Al., 1989].
- La *proteina acida gliofibrillare* (GFAP): è una proteina tipica dei filamenti intermedi degli astrociti ed esiste in varie isoforme, alcune della quali sono citrullinate. Il ruolo fisiologico della deiminazione della GFAP è ancora sconosciuto, tuttavia vi è qualche evidenza che, con la citrullinazione, i filamenti di GFAP siano più facili da disassemblare. Nel sistema nervoso centrale è espressa solo l'isoforma PAD2 [Sambandam et Al., 2004], la PAD4 vi si trova solo quando è presente un infiltrato leucocitario (neutrofili, monociti, linfociti T e B che esprimono elevati livelli di PAD4). La PAD2 sembra attivarsi durante la neurodegenerazione. In condizioni di ipossia, la quantità di mRNA della PAD2 è aumentata negli astrociti di tipo II. La deiminazione di GFAP è caratteristica di alcune malattie come il morbo di Alzheimer. Ciò solleva la possibilità che la citrullinazione possa essere un marker precoce di malattie neurodegenerative, nelle quali però non si osservano anticorpi anti-proteine citrullinate.
- La *proteina basica della mielina* (MBP): è sintetizzata dalle cellule oligodendrogliali. La guaina mielinica è costituita da due componenti: i lipidi e le proteine. Le proteine compattano il doppio strato lipidico e formano una struttura molecolare complessa. Un elemento chiave nella formazione della guaina è l'interazione lipidi-proteina che si basa sulle interazioni ioniche tra la carica negativa (fosfatidil-serina e gangliosidi contenenti acido sialico) e le proteine basiche (MBP, lipofilina). Qualsiasi modifica del punto isoelettrico di queste proteine può causare cambiamenti nell'interazione con i lipidi. MBP è sintetizzata in varie isoforme che possono subire alcune modifiche post-traduzionali, quali la deaminazione, deiminazione, metilazione e fosforilazione:

si producono così numerose 'isoforme secondarie' denominate 'isomeri carichi', che hanno diversi punti isoelettrici. La citrullinazione di MBP (MBP-CIT) riduce l'interazione con la carica negativa della fosfatidil-serina a causa della perdita di residui basici: MBP-CIT non è in grado di formare guaine compatte. La citrullinazione di MBP incide anche sulla velocità della sua degradazione da parte della metalloproteinasi catepsina D.

- La *fibrina*: placche di fibrina si ritrovano frequentemente nel tessuto sinoviale. In condizioni fisiologiche, piccole quantità di fibrinogeno (FBG) e di altre proteine pro-coagulanti possono penetrare la parete capillare e dirigersi verso l'interstizio, dove possono essere tagliate in peptidi di fibrina e dove i monomeri di fibrina possono produrre placche locali. La fibrina polimerizzata è degradata dalla plasmina, una serin-proteasi che taglia vicino ai residui amminoacidici basici (Arg e Lys). La scomparsa di arginina dovuta alla deiminazione riduce il numero dei siti di taglio e quindi aumenta la quantità del polimero di fibrina. La citrullinazione della fibrina rende anche la molecola antigenica, riconosciuta dagli ACPA.
- Gli *istoni*: in particolare H2A, H3 e H4 [Hagiwara et Al., 2002].
- La *nucleofosmina/B23* [Hagiwara et Al., 2002].

CAPITOLO 2

Gli istoni nella diagnosi di artrite reumatoide

Gli istoni

Gli istoni sono proteine tipiche degli organismi eucarioti, anche se alcuni tipi di cellule eucariotiche come gli eritrociti ne sono privi. Gli istoni sono proteine a basso peso molecolare complessivamente cariche positivamente perché posseggono un elevato numero di amminoacidi in particolare lisina e arginina caratterizzati da catena laterale che a pH fisiologico acquisisce carica positiva: questo permette loro di interagire con il DNA che, essendo ricco di gruppi fosfato, è carico negativamente.

Esistono cinque tipi di istoni: H1, H2A, H2B, H3, H4. Gli istoni H2A, H2B, H3, H4 (istoni del core) formano un ottamero intorno al quale il DNA si avvolge in modo sinistrorso formando una struttura chiamata nucleosoma. Il diametro del nucleosoma è di 11 nm, il DNA si avvolge attorno all'ottamero istonico per 1,65 giri, interagendo con gli istoni essenzialmente tramite legami idrogeno: in totale ogni nucleosoma ha 146bp di DNA avvolte intorno. L'istone H1 si occupa di organizzare fra loro i diversi nucleosomi mantenendo i contatti fra 2 nucleosomi adiacenti: senza H1 i nucleosomi non potrebbero ordinarsi nelle successive strutture di impacchettamento del DNA.

Gli istoni sono la più antica famiglia conosciuta di proteine: sono stati scoperti da Albrecht Kossel nel 1884; sono talmente antichi che il motivo per cui hanno un nome di origine tedesca, *histon*, si è perso nell'oscurità; forse deriva dal greco *histanai* o *histos* che significa mantenere al posto.

Gli istoni sono soggetti a numerose modificazioni posttraslazionali: acetilazione, metilazione, poli-(ADP ribosil)azione, ubiquitinazione, sumoilazione e, soprattutto, fosforilazione. È stato inoltre scoperto che gli istoni possono andare incontro alla deiminazione, modificazione posttraslazionale catalizzata dall'isoenzima 4 della PAD [Hagiwara et Al., 2002; Nakashima et Al., 2002; Vossenaar et Al., 2003; Arita et Al., 2004]: solo gli istoni H2A, H3 e H4 sono deiminati, mentre l'H2B non lo è.

Per molto tempo si è pensato che gli istoni fossero unicamente un supporto per il DNA, ma ben presto i ricercatori si sono resi conto di quanto avessero sottovalutato le potenzialità di queste piccole ma interessanti proteine. Un'importante funzione degli istoni è la regolazione della trascrizione genica; è noto infatti che la metilazione [Cuthbert et Al., 2004; Wang et Al., 2004; Raijmakers et Al., 2007] dei residui di arginina degli istoni modula l'accessibilità ai geni dei fattori di trascrizione e di molte altre proteine [Parseghian e Luhrs, 2006].

Wang e collaboratori hanno osservato che la PAD4 deimina numerosi residui di arginina degli istoni antagonizzando la metilazione delle arginine; inoltre la PAD4 è in grado di ri-convertire le mono metil-arginine in citrulline e antagonizzare in tal modo l'induzione della trascrizione. La PAD4 ha come bersaglio molti siti degli istoni H3 e H4, compresi quelli metilati da CARM1 e PRMT1 (due metiltransferasi che agiscono rispettivamente sull'H3 e sull'H4) [Wang et Al., 2004]. Come dimostrato da Cuthbert e suoi collaboratori, una diminuzione della metilazione delle arginine dell'H3 con

conseguente aumento della citrullinazione è coinvolta nella inibizione della trascrizione del gene pS2 attivato dagli estrogeni [Cuthbert et Al., 2004].

Sebbene la localizzazione prevalente sia all'interno del nucleo gli istoni si possono trovare anche in altri compartimenti della cellula e addirittura al di fuori di essa [Kimura e Cook, 2001; Kimura et Al., 2005].

La presenza di istoni nel citoplasma non è una novità: l'istone H1, migrando dal nucleo ai mitocondri è in grado di indurre apoptosi [Konishi et Al., 2003]; Zlatanova e collaboratori hanno isolato l'H1 nel citoplasma di cellule di fegato di topo e nella linea eritroleucemica Friend [Zlatanova et Al., 1990]; Smith e collaboratori hanno evidenziato pool di H1 e H3 nel citoplasma di cellule dello strato granuloso e dello strato corneo della cute [Smith et Al., 1989].

Anche le altre classi di istoni vengono rilasciati dal nucleo durante l'apoptosi [Wu et Al., 2002].

Gli istoni possono inoltre ritrovarsi sulla membrana di diverse linee cellulari e fungere qui da recettore: l'H1, per esempio, sulla membrana dei macrofagi murini, lega la tireoglobulina [Brix et Al., 1998]; l'H2B, sulla membrana dei neutrofilii e della linea monocitoide U937 attivata con la PMA, funge da recettore per il plasminogeno [Herren et Al., 2006].

Il movimento degli istoni dal nucleo al citoplasma, alla membrana cellulare, o all'ambiente extracellulare non è certo una strada a senso unico: è infatti dimostrata la capacità degli istoni che si trovano all'esterno della cellula di attraversare la membrana plasmatica e di entrare nel citoplasma. Gli istoni sono anche in grado di mediare la penetrazione di molecole (come l'albumina bovina) che sono covalentemente legate a essi, indicando un potenziale ruolo di carrier all'interno di cellule viventi [Hariton-Gazal et Al., 2003]. Questo fenomeno non è ancora completamente chiarito: gli istoni sembrano penetrare all'interno della cellula per diretta traslocazione attraverso la membrana plasmatica in modo energia-indipendente e non tramite una tipica endocitosi [Hariton-Gazal et Al., 2003]. Ulteriori studi sono necessari per determinare se la capacità di penetrare le membrane da parte degli istoni possa avere delle conseguenze in vivo, sia nell'attività cellulare normale che nei processi patologici.

Gli istoni e frammenti di essi hanno importante attività antimicrobica e agiscono nella mucosa e nel lume di diversi tessuti, suggerendo che facciano parte di un antico sistema dell'immunità innata [Rose et Al., 1998; Kim et Al., 2000; Park et Al., 1998].

Nell'uomo gli istoni sembrano interagire con proteine rilasciate durante la fase acuta dell'infiammazione come la proteina C reattiva (PCR) [Du Clos et Al., 1991; Minota et Al., 1993]. H2A e H4 sono in grado di legare LPS: l'H2A extracellulare inibisce il legame di LPS ai macrofagi e la produzione LPS-indotta di TNF α e NO da parte di queste cellule [Augusto et Al., 2003].

Scopo del lavoro.

Sulla base dei dati presenti in letteratura e ricapitolati in questa introduzione possiamo quindi affermare che gli istoni possono essere deiminati, che possono essere liberati dalla cellula e trovarsi nello spazio extracellulare.

Per questo abbiamo deciso di valutare se gli istoni deiminati possono essere riconosciuti dal sistema immunitario dei pazienti con AR e diventare target di risposta anticorpale. In alcuni esperimenti preliminari eseguiti nel nostro laboratorio, avevamo deiminato in vitro tutte le cinque proteine istoniche allo scopo di utilizzarle come antigene, sia in blot che in ELISA, per la ricerca degli anticorpi nei sieri di pazienti con artrite reumatoide. In questi test preliminari, in cui avevamo analizzato un numero ristretto di campioni, solo l'istone H4 sembrava dare una reattività specifica con i sieri dei pazienti con AR. Che l'H4 fosse l'istone più interessante per il nostro studio era stato confermato anche da un'altra serie di esperimenti (eseguiti sempre nel nostro laboratorio): avevamo infatti studiato gli istoni purificati dai nuclei di granulociti attivati con un calcio ionoforo (per attivare la PAD) e avevamo osservato che l'H2A, l'H3 e l'H4 vengono deiminati ma solo quest'ultimo è riconosciuto dai sieri dei pazienti con AR. Alla luce di questi risultati abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione sull'H4.

Materiali e metodi

Deiminazione in vitro. Abbiamo utilizzato una PAD purificata dal muscolo scheletrico di coniglio acquistata dalla SIGMA ALDRICH. L'istone H4 è una proteina umana purificata, è disponibile commercialmente dalla ROCHE Diagnostics.

La reazione di deiminazione prevede l'incubazione dell'H4 per 2h a 37°C con e senza la PAD (3,5 UI/mg di proteina), in 0,1 M TRIS-HCl pH 7.4, 5mM ditioneitol-DTT, 10mM CaCl₂. Il CaCl₂ serve ad attivare la PAD, enzima Ca²⁺ dipendente. La reazione viene bloccata con l'aggiunta di 10mM EDTA, che ha la funzione di chelare gli ioni Ca²⁺, inibendo così l'attività dell'enzima.

Dot Blot. Abbiamo utilizzato strisce di nitrocellulosa (40x10 mm) in cui sono stati adsorbiti 2 µl di H4 e di H4 deiminato diluiti in tampone carbonato pH 9.6 alla concentrazione di 250 µg/ml. Si lascia in incubazione a 4°C overnight o comunque fino a completa evaporazione del tampone di diluizione. In seguito i siti reattivi della nitrocellulosa vengono bloccati utilizzando un tampone di saturazione composto da PBS, gelatina 1%, lasciando in incubazione le strisce per 45 minuti a temperatura ambiente in agitazione. I sieri diluiti 1:100 in PBS, gelatina 0.5%, Tween-20 0.05% sono incubati con le strisce di nitrocellulosa per 3 ore a temperatura ambiente in agitazione. Il legame degli anticorpi agli antigeni adsorbiti sulla nitrocellulosa viene evidenziato con un anticorpo secondario anti-IgG umane coniugato con la perossidasi. La perossidasi scinde il substrato utilizzato producendo una molecola rilevabile mediante chemiluminescenza e il segnale emesso è analizzato mediante il sistema Versadoc 1000 Biorad.

Protocollo base di un test ELISA-metodo indiretto.

- **Il coating.** È quel processo attraverso cui l'antigene, verso il quale sono diretti gli anticorpi che si ricercano, viene fatto aderire al fondo dei pozzetti delle piastre per ELISA. Generalmente questo avviene grazie a legami aspecifici tra la proteina e il materiale di cui è composta la piastra, che sono facilitati dal pH del tampone nel quale viene fatta avvenire la reazione. Nella messa a punto di un test ELISA sono valutati diversi tipi di piastre, diversi tipi di tamponi di coating

e diverse concentrazioni di antigene.

- La saturazione. Con il coating non si “ricoprono” tutti i siti reattivi della piastra. Ogni spazio della piastra non occupato dall’antigene consente l’adsorbimento di altre proteine: questo contribuisce a determinare una reazione aspecifica delle varie componenti del test. La saturazione serve quindi a saturare il fondo del pozzetto in modo da ridurre drasticamente la possibilità che, nelle fasi successive, si abbiano legami di tipo aspecifico. La scelta dell’agente saturante è molto importante e rappresenta uno dei punti critici della messa a punto di un test.
- Diluizione del campione. Il campione da noi utilizzato è rappresentato dal siero di pazienti con AR e di soggetti normali. La diluizione si sceglie in maniera empirica, e, all’inizio, si fanno diverse prove con diluizioni differenti. Il tampone di diluizione ha un pH neutro e contiene l’agente saturante in concentrazioni minori rispetto al tampone di blocco e un detergente non ionico tipo Tween-20. L’agente saturante e il detergente non ionico nel tampone di diluizione hanno lo scopo di diminuire le reazioni antigene anticorpo deboli o aspecifiche.
- Lavaggi della piastra. Sia al termine del periodo di incubazione con i sieri che dopo il periodo di incubazione dell’anticorpo secondario coniugato, vengono effettuati tre lavaggi per eliminare quello che eventualmente non si è legato o si è legato in modo poco specifico. La scelta della concentrazione di detergente e di sale nel tampone di lavaggio influenza il risultato finale del test.
- Incubazione dell’anticorpo secondario. È il nostro “strumento” per rilevare l’eventuale presenza degli anticorpi proteina-specifici presenti nel siero: è un anticorpo coniugato con un enzima e diretto verso le immunoglobuline umane. Nel nostro caso l’enzima è la fosfatasi alcalina. L’anticorpo secondario viene diluito nello stesso tampone in cui si diluisce il siero.
- Sviluppo del test. È quel processo attraverso il quale possiamo visualizzare se è avvenuto il legame. Nel nostro caso si usa un substrato specifico della fosfatasi alcalina: il paranitrofenilfosfato (PNPP). Il PNPP è un cromogeno: quando la fosfatasi alcalina incontra la molecola di PNPP la scinde in p-nitrofenolo e fosfato inducendo la formazione del colore. La reazione di sviluppo avviene a pH 9.5 e in presenza di $MgCl_2$, che sono condizioni ottimali per l’attività dell’enzima fosfatasi.
- Lettura. Avviene con lo spettrofotometro a una lunghezza d’onda che legge il “colore” sviluppato dalla reazione dell’enzima con il substrato, nel nostro caso a 405 nm. La presenza di almeno un controllo negativo e di almeno un controllo positivo, ripetuti in ogni test, permette di dare risultati semi quantitativi e di verificare le variazioni tra saggi effettuati in momenti e condizioni diverse.

Test ELISA per la ricerca di Ab anti-H4 deiminato.

Nella messa a punto di un saggio ottimale per la determinazione di anticorpi anti istone H4 deiminato, abbiamo analizzato diversi fattori:

- Tipo di piastra: abbiamo utilizzato piastre di polistirene di diversa fabbricazione (COSTAR e NUNC), entrambe a elevata capacità di legame. Il polistirene è

un materiale molto resistente, dalle proprietà ottiche ottimali e biologicamente inerte. La capacità di legame può variare, ma dato il ridotto peso molecolare degli istoni e la loro carica netta decisamente basica, abbiamo scelto piastre a elevato potere di adsorbimento, per ottenere un coating uniforme e un basso livello di background.

- Tampone di coating: tampone carbonato a pH molto basico (pH = 9.6).
- Tipo di agente saturante: abbiamo confrontato tra loro tamponi di blocco contenenti albumina serica bovina (BSA) e gelatina bovina (BG), in particolare PBS, BSA 3% e PBS, BG 1%.
- Tipo di tampone di diluizione del campione: poiché gli istoni sono molecole molto cariche tendono a dare reazioni aspecifiche a bassa affinità con le immunoglobuline presenti nei campioni da dosare. Tali reazioni possono essere teoricamente eliminate aumentando la forza ionica dei tamponi di diluizione. Per questo motivo abbiamo effettuato prove aggiungendo al tampone di diluizione differenti concentrazioni di NaCl (comprese tra 0 e 1M).
- Tipo di tampone di lavaggio: è un tampone a pH neutro, caratterizzato da concentrazioni di NaCl relativamente alte (0,150 M) e dalla presenza di un detergente non ionico (Tween-20). Il detergente è importante per eliminare le proteine legate in modo labile e per bloccare i siti che possono essere liberati per la perdita di proteine durante le procedure di lavaggio. Nel nostro caso abbiamo confrontato due procedure di lavaggio caratterizzate da concentrazioni diverse di Tween-20: nella prima procedura viene effettuato un lavaggio con PBS, 1% Tween-20 e due lavaggi con PBS; nella seconda procedura vengono effettuati tre lavaggi con PBS, 0,05% Tween-20. La prima procedura è decisamente più aggressiva della seconda: si ha un background minore, ma anche un minore segnale specifico.

All'inizio abbiamo analizzato un numero limitato di sieri (10 di pazienti con AR e 10 di soggetti sani) selezionati presso l'Unità Operativa di Immunoallergologia dell'Università di Pisa. Tali analisi hanno condotto a definire le condizioni ottimali del test ELISA per la ricerca di anticorpi anti-H4 deiminato e per il confronto con la reattività verso l'istone H4 non deiminato.

La metodica che ha dato i risultati migliori è la seguente:

- Diluizione degli istoni H4 e H4 deiminato in tampone carbonato pH 9.6 alla concentrazione di 10 µg/ml, incubati overnight a 4°C.
- Saturazione con PBS, BSA 3% per 30 minuti in agitazione a temperatura ambiente.
- Sieri diluiti 1:100 con PBS, BSA 1%, Tween-20 0,05%, NaCl 0,5 M e incubati per 3 ore in agitazione a temperatura ambiente.
- Lavaggi (3) con PBS, Tween-20 0,05%.
- Anticorpo secondario (anti-human IgG F(ab')₂ coniugato con la fosfatasi alcalina) diluito 1:3000 in PBS, BSA 1%, Tween-20 0,05% e lasciato per 3 ore in agitazione a temperatura ambiente.
- Lavaggi (3) con PBS, Tween-20 0,05%.
- Sviluppo e lettura.

Ricerca degli anticorpi anti-H4 deiminato in NHS e sieri AR.

Mediante tale protocollo abbiamo, quindi, valutato la presenza di anticorpi anti-H4 deiminato in 56 NHS e 67 pazienti con AR.

I risultati sono stati espressi in percentuale di positività rispetto a un controllo positivo interno al test, definito arbitrariamente come 100%. I risultati ottenuti sono stati poi analizzati mediante test statistici non parametrici.

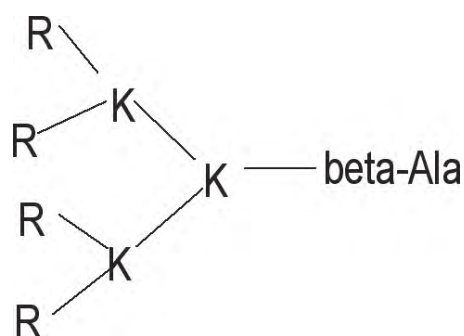
Sintesi dei peptidi lineari multipli.

I peptidi sono stati sintetizzati presso Toscana Biomarkers s.r.l. e vengono ottenuti per sintesi su fase solida utilizzando aminoacidi F-moc, secondo il metodo di Merrifield [Merrifield, 1963], modificato da Atherton [Atherton e Sheppard, 1989] (tab. 1); come peptidi lineari o come peptide antigenico multiplo (MAP) in cui quattro sequenze identiche sono sintetizzate su un'impalcatura di lisine [Tam, 1988].

Nome	Sequenza amminoacidica
L i n - HCP1	G A K Cit H Cit K V L Cit D N I Q G I T K P A I
L i n - HCP2	K P A I Cit Cit L A Cit Cit G G V K Cit I S G L I
M A P - HCP1	(G A K Cit H Cit K V L Cit D N I Q G I T K P A I) ₄ K ₂ K βA
M A P - HCP2	(K P A I Cit Cit L A Cit Cit G G V K Cit I S G L I) ₄ K ₂ K βA

Tab 1: sequenza amminoacidica dei peptidi derivati dall'istone H4

Indicato con R il peptide, la struttura del MAP corrispondente può essere schematizzata nel modo seguente:



Ogni peptide è legato con il suo gruppo carbossilico terminale ai gruppi amminici in α e in ϵ di un core compatto e ramificato di Lys, producendo una struttura dendritica da cui ciascuno emerge.

Ricerca degli anticorpi anti-HCP1 e anti-HCP2 lineari e MAP

Il test ELISA basato su peptidi è stato effettuato su sieri di soggetti sani e sieri di soggetti con AR selezionati presso l'Unità Operativa di Immunoallegologia dell'Università di Pisa.

Il protocollo utilizzato per il test ELISA sui peptidi è il seguente:

- Diluizione dei peptidi in tampone carbonato pH 9.6 alla concentrazione di 20 µg/ml per i peptidi lineari e 10 µg/ml per i peptidi MAP, incubati overnight a 4°C.
- Saturazione con PBS, gelatina 1% per 45 minuti in agitazione a temperatura ambiente.
- Sieri diluiti 1:100 con PBS, gelatina 0,5%, Tween-20 0,05%, incubati per 3 ore in agitazione a temperatura ambiente.
- 3 lavaggi di cui il primo con PBS, Tween-20 1% e i seguenti con solo PBS.
- Anticorpo secondario (anti-human IgG F(ab')₂ coniugato con la fosfatasi alcalina) diluito 1:3000 in PBS, gelatina 0,5%, Tween-20 0,05% e lasciato per 3 ore in agitazione a temperatura ambiente.
- 3 lavaggi di cui il primo con PBS, Tween-20 1% e i seguenti con solo PBS.
- Sviluppo e lettura.

La percentuale di positività di ogni campione è stata individuata rapportando l'OD di ogni campione all'OD di un controllo molto positivo inserito come standard in ogni test al quale è stato dato arbitrariamente il valore di 100. I risultati ottenuti sono stati poi analizzati mediante test statistici non parametrici.

Analisi statistica. Per l'analisi statistica sono stati utilizzati test non parametrici. Il confronto tra pazienti con AR e soggetti sani, per quanto riguarda variabili quantitative quali la positività per un determinato anticorpo, è stato effettuato mediante il test U di Mann-Whitney. La valutazione della correlazione tra variabili in una stessa popolazione è stata effettuata mediante l'analisi del coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman. Valori di $p < 0,05$ sono stati considerati significativi. L'analisi statistica è stata fatta mediante il software Prism 4.0 per Windows (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

Purificazione degli anticorpi: avviene mediante precipitazione in solfato d'ammonio (*Ammonium Sulphate Cut*, AS CUT), che è uno dei metodi più utilizzati per rimuovere proteine da una soluzione. Le proteine in soluzione formano legami a idrogeno con l'acqua attraverso l'esposizione dei loro gruppi polari e ionici. Quando si aggiungono alte concentrazioni di ioni piccoli e fortemente carichi come quelli di ammonio o di solfato, questi gruppi competono con le proteine per il legame con l'acqua. Ciò rimuove le molecole d'acqua dalle proteine e diminuisce la loro solubilità, determinandone la precipitazione. I fattori che influenzano la concentrazione alla quale una particolare proteina precipita sono il numero e la posizione dei gruppi polari, il peso molecolare della proteina, il pH della soluzione e la temperatura alla quale si effettua la precipitazione. La concentrazione a cui precipitano gli anticorpi varia da specie a specie: nel caso delle immunoglobuline umane la saturazione del 50% è la condizione migliore. Al

termine di questa procedura si ottiene una preparazione arricchita in immunoglobuline ma contenente anche numerose altre proteine plasmatiche. Nello specifico la tecnica prevede di determinare il volume del plasma e centrifugare a 3000g per 30 minuti a +4°C per rimuovere aggregati e detriti; trasferire il sovrantante in un becker, aggiungere un magnete per l'agitazione e posizionare su un agitatore magnetico. A questo punto si aggiunge lentamente un volume di soluzione di solfato d'ammonio saturo pari a quello del plasma, in modo da portarlo a una concentrazione finale del 50%. Trasferire a +4°C per 6 ore oppure overnight. Dopo l'incubazione si centrifuga a 3000g per 30 minuti, si rimuove accuratamente il sovrantante e si risospende il pellet, contenente la frazione di immunoglobuline, in un volume di PBS pari al 30-50% di quello iniziale. La soluzione di anticorpi viene trasferita in una membrana da dialisi e dializzata contro PBS overnight. La soluzione di anticorpi viene raccolta dalla membrana e centrifugata per rimuovere eventuali detriti rimasti. Quindi si determina la concentrazione e la purezza della soluzione degli anticorpi, mediante analisi spettrofotometrica (lunghezza d'onda = 280 nm).

Cromatografia di affinità CNBr-activated Sepharose 4B: per purificare gli ACPA è stata utilizzata la cromatografia di affinità su antigeni citrullinati. La resina utilizzata è una resina di sefarosio attivato con CNBr (fig. 1). Nel Sefarosio-CNBr la reazione del bromuro di cianogeno con il sefarosio determina un prodotto di reazione a cui possono essere legati proteine, acidi nucleici o altri biopolimeri. In questo caso, al prodotto di reazione vengono legati gli antigeni HCP1, HCP2. Il bromuro di cianogeno reagisce con i gruppi idrossilici sul Sefarosio. I gruppi reattivi dominanti nel Sefarosio-CNBr sono i gruppi estere di cianato. I gruppi attivati reagiscono con i gruppi amminici primari del ligando per formare legami covalenti:

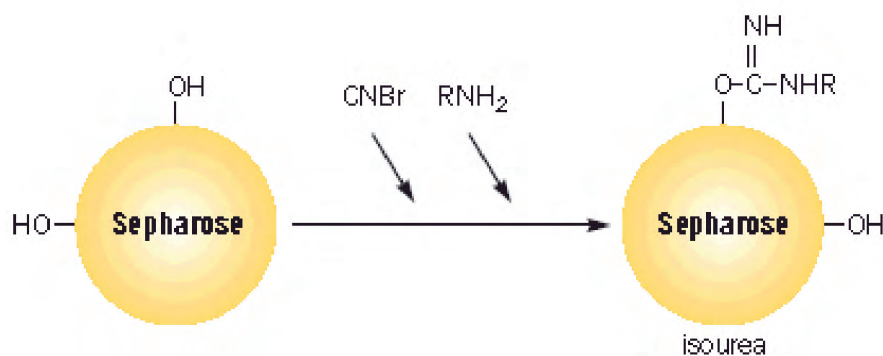


Fig. 1. Attivazione di una resina di sefarosio con CNBr ed accoppiamento del ligando alla matrice attivata.

Il Sefarosio-CNBr in polvere viene risospeso in HCl 1 mM (200 ml/g) e lavato abbondantemente; i peptidi da legare alla colonna vengono risospesi in coupling buffer (NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,3 contenente NaCl 0,5 M). Si utilizzano circa 10 mg di peptidi per ml di gel. I peptidi vengono quindi incubati con la resina mantenendo in agitazione overnight a +4°C. I gruppi reattivi della resina rimasti liberi vengono bloccati mediante una soluzione di glicina 0,2 M, pH 8,0, per 16 ore a +4 °C. La resina viene quindi lavata

con il coupling buffer alternato a lavaggi con acetate buffer (CH_3COONa 0,1 M, pH 4, NaCl 0,5 M) per eliminare l'eccesso di antigene e l'eccesso di agente bloccante. Questo protocollo è stato eseguito per ciascuno dei due peptidi: ogni colonna è stata utilizzata per purificare anticorpi specifici per i due peptidi citrullinati usati.

Purificazione degli anticorpi: la colonna viene equilibrata con tampone fosfato 20 mM ($\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$). Il campione da passare in colonna viene centrifugato a 2000 rpm per 10 minuti e il surnatante viene filtrato utilizzando filtri con pori da 0,45 μm di diametro, per eliminare eventuali aggregati che possono bloccare la colonna. Il campione viene quindi fatto passare attraverso la colonna più volte: le IgG specifiche per il peptide legato alla colonna si legano al peptide stesso. La colonna viene lavata con tampone fosfato 20 mM fino a quando la $A_{280\text{nm}} < 0,02$. Gli anticorpi legati vengono eluiti con glicina 0,1 M pH 2.8. Quindi si misura la $A_{280\text{nm}}$ degli eluati e si tampona subito il pH con TRIS 1 M, pH 11. L'effettiva specificità degli anticorpi purificati anti-HCP1 e anti-HCP2 è viene valutata eseguendo un test ELISA indiretto: il coating viene fatto su piastre di polistirene da 96 pozzetti NUNC Maxisorp, utilizzando i peptidi HCP1 e HCP2 diluiti in tampone carbonato pH 9,6 (HCP) e con un'incubazione della durata di una notte. Per evitare legami aspecifici degli anticorpi col supporto plastico, la piastra viene bloccata per un'ora con PBS Gelatina Porcina 1%. Rimosso l'eccesso del tampone di saturazione, i vari anticorpi purificati, diluiti in PBS Gelatina porcina 0,5%, Tween 20 0,05% vengono incubati per 3 ore a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi, uno con PBS Tween 20 1% e due con PBS, è stato aggiunto l'anticorpo secondario, e incubato a temperatura ambiente per 3 ore. Quindi sono stati eseguiti nuovamente i lavaggi, come in precedenza, ed è stato fatto lo sviluppo. La lettura viene fatta con lo spettrofotometro a 405 nm.

Test di inibizione: abbiamo esaminato la capacità di alcuni peptidi, citrullinati e non, utilizzati in concentrazione decrescente, di inibire il legame degli anti-HCP1 e degli anti-HCP2 al rispettivo antigene. Si tratta di un test ELISA di tipo indiretto. I peptidi HCP1 e HCP2 sono diluiti in tampone carbonato a pH 9,6 alla concentrazione di 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, caricati su piastre da 96 pozzetti NUNC Maxisorp (50 μl per pozzetto) e incubati overnight a +4 °C. La piastra viene bloccata con PBS- Gelatina porcina 1% (100 μl per pozzetto) per 1 ora a temperatura ambiente. I peptidi citrullinati utilizzati per inibire il legame degli anticorpi sono HCP1, HCP2, VCP1 e VCP2 (due peptidi citrullinati derivati dalle proteine del virus di Epstein-Barr EBNA-1 ed EBNA-2 rispettivamente), mentre i peptidi non citrullinati sono SCL 70 (derivato dalla sequenza della topoisomerasi 1) e P30 (peptide del tossoide tetanico). In ogni test, il peptide citrullinato uguale a quello adeso sulla piastra funge da controllo positivo, quelli non citrullinati da controllo negativo, poiché non possono competere con il peptide di coating per il legame con l'anticorpo. I peptidi vengono diluiti in PBS-Gelatina 0,5% Tween 20 0,05% mediante diluizioni scalari 1:4, partendo dalla concentrazione di 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e terminando con la concentrazione di 0,625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e vengono fatti incubare, per 30 minuti a temperatura ambiente, con un volume uguale di anticorpo, diluito nello

stesso tampone alla concentrazione di 2,5 µg/ml. Dopo aver eliminato dalla piastra l'eccesso della soluzione di blocco, i complessi peptide-anticorpo vengono caricati sulla piastra in volume di 50 µl per pozzetto. Per identificare il massimo legame dell'ACPA al relativo peptide, vengono caricati dei pozzetti con un volume uguale di soluzione di anticorpo senza alcun peptide di competizione. Il bianco è costituito dal tampone di diluizione. Ciascun campione è stato testato in doppio e, dopo la lettura spettrofotometrica finale, per ognuno è stata calcolata la media delle densità ottiche rilevate. Il periodo di incubazione è di 2,5 ore. Si fanno tre lavaggi (1 con PBS Tween 20 1% e 2 con PBS) e si incuba con l'anticorpo secondario anti-IgG umane (50 µl per pozzetto). Dopo l'incubazione a temperatura ambiente per 2,5 ore, si fanno i soliti tre lavaggi e si procede allo sviluppo. Anche in questi tests la determinazione del legame fra anticorpo e peptide adeso al supporto viene eseguita con la lettura spettrofotometrica a 405 nm.

I risultati sono espressi come percentuale di inibizione verso concentrazione del peptide che compete: il 100% di inibizione è dato dal segnale del bianco, lo 0% di inibizione è dato dal segnale dell'anticorpo non incubato con alcun peptide.

Risultati

Lo scopo di questo studio è quello di valutare se nel siero dei pazienti con AR sono presenti anticorpi anti istoni deiminati e definire un protocollo che permetta la loro valutazione in modo riproducibile, sensibile e specifico.

Per fare ciò abbiamo deiminato in vitro l'istone H4 seguendo metodi disponibili in letteratura e già utilizzati nel nostro laboratorio per altre proteine. L'istone H4 nativo e la proteina deiminata vengono quindi utilizzati per alcuni saggi in dot blot al fine di verificare, in modo semplice, la presenza di anticorpi nei pazienti con AR.

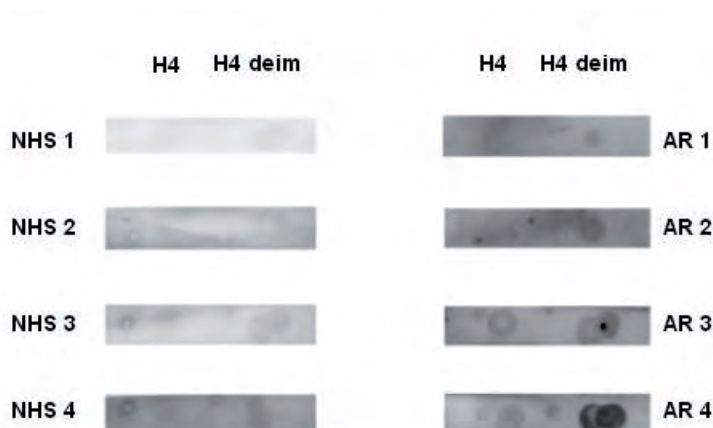


Fig. 2: dot blot

Come si osserva nella fig. 2 i sieri dei pazienti con AR danno un segnale più intenso rispetto agli NHS (sieri di soggetti sani), soprattutto nei confronti degli istoni H4 deiminati. Possiamo vedere tuttavia, che, anche gli NHS, hanno una certa reattività, con l'istone H4 sia deiminato che non. Questi risultati fanno supporre l'esistenza di

una differente reattività tra gli NHS e i sieri AR che però non viene messa in particolare evidenza con il dot blot. Per questo abbiamo deciso di provvedere alla messa a punto di un test ELISA.

Data l'elevata carica intrinseca degli istoni, il coating per il test ELISA è stato effettuato su piastre a elevata capacità di adsorbimento.

Dalla prima analisi effettuata in dot blot abbiamo osservato che alcuni soggetti sani mostravano reattività con gli istoni, sia deiminati che non deiminati. Al fine di verificare se gli anticorpi presenti nei soggetti sani hanno un'affinità diversa da quelli presenti nei pazienti con AR, abbiamo effettuato nel test ELISA alcune prove in presenza di concentrazioni più elevate di NaCl nel tampone di diluizione dei sieri.

Abbiamo osservato che in presenza di NaCl 1M (fig 3c) la reattività verso gli istoni deiminati tende a diminuire, mentre a concentrazioni fisiologiche di NaCl (150 mM) (fig 3b) tende a essere troppo alta la reattività verso gli istoni non deiminati.

Per trovare la forza ionica ottimale abbiamo provato a usare un tampone di diluizione dei sieri contenente NaCl 0,5 M (Fig 3a): questo ci ha permesso di ottenere una migliore discriminazione tra i pazienti con AR e i soggetti sani e nel contempo di abbassare la reattività verso gli istoni non deiminati.

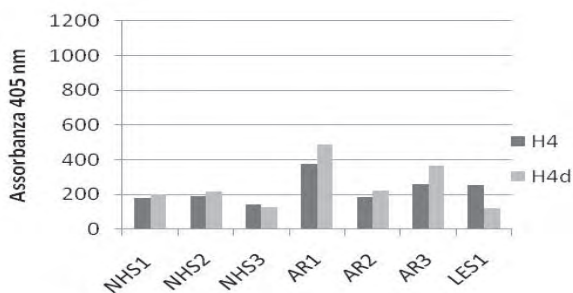


Fig 3a: NaCl 0.5M

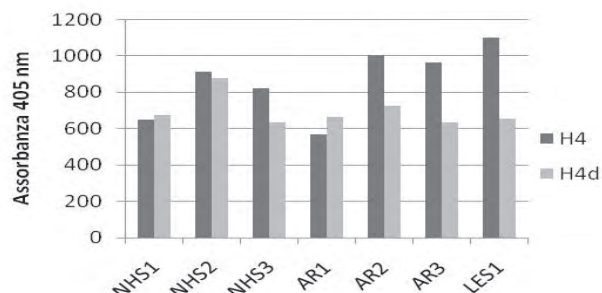


Fig 3b: senza NaCl

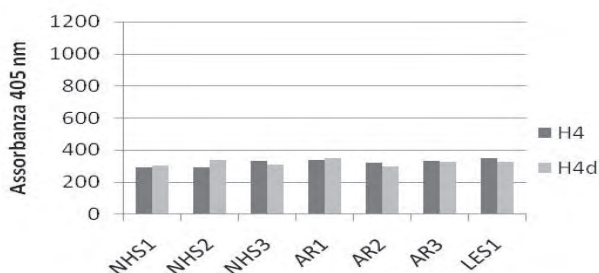


Fig 3c: NaCl 1M

Nonostante l'uso di NaCl nel tampone di diluizione, la discriminazione tra pazienti con AR e NHS e tra H4 deiminato e H4 non era ancora tale da poterci permettere di misurare anticorpi specifici. Abbiamo quindi provato ad agire sulla soluzione di blocco, confrontando due agenti saturanti tra quelli più comunemente utilizzati: l'albumina sierica bovina e la gelatina bovina.

La concentrazione di NaCl nel tampone di diluizione degli anticorpi era ormai fissata a 0.5M.

Nelle prove effettuate abbiamo osservato che il blocco in gelatina non permette una particolare discriminazione tra soggetti sani e soggetti con AR; inoltre si osserva una

reattività simile con l'istone non deiminato e deiminato. La saturazione con BSA, invece, permette di individuare una reattività deiminazione-specifica e permette di discriminare tra pazienti e soggetti sani (Fig. 4a e 4b).

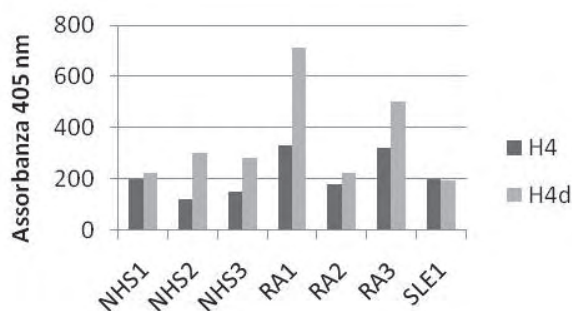


Fig 4a: tampone saturante contenente la BSA

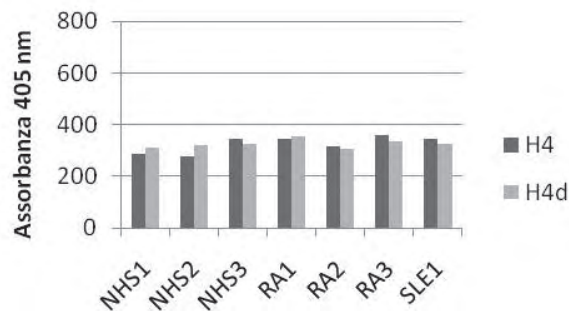


Fig 4b: tampone saturante contenente la Gelatina

Il legame degli anticorpi è influenzato anche dalla quantità di detergente nel tampone di lavaggio. Abbiamo quindi confrontato due diverse combinazioni di lavaggio: in un caso tre lavaggi con PBS, Tween 0,05% e in un altro caso un lavaggio con PBS, Tween 1% e due con PBS.

Abbiamo potuto osservare che non esistono grandi differenze tra i due tipi di lavaggio e abbiamo scelto di effettuare le analisi in PBS, Tween 0,05% per comodità (Fig 5a e 5b).

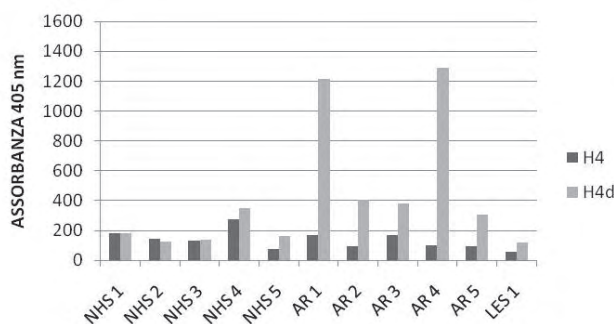


Fig 5a: 3X PBS, Tween-20 0.05%

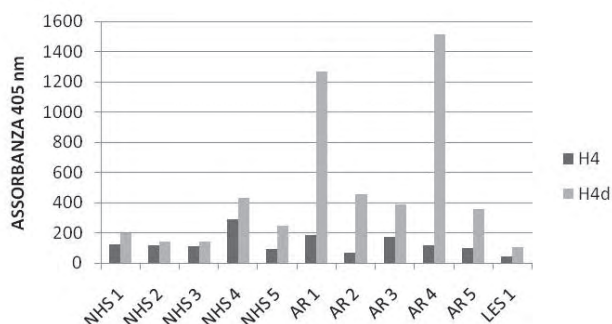


Fig 5b: 1X PBS, Tween-20 1% e 2X PBS

Dopo aver valutato questi parametri abbiamo voluto verificare se, utilizzando una piastra con un volume del pozzetto ridotto del 50% (le COSTAR H.W.), si ottenevano gli stessi risultati rispetto a una piastra con pozzetti classici (NUNC). Dalla Fig 6a e 6b si osserva che non ci sono differenze tali che ci portino a scegliere l'una o l'altra tipologia di piastra. Si preferiscono le COSTAR semplicemente perché ci permettono di risparmiare materiale (soprattutto l'antigene).

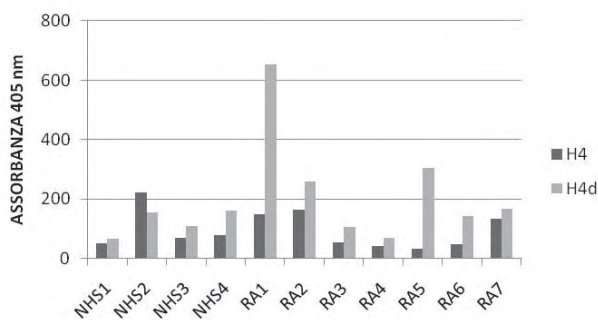


Fig 6a: COSTAR H.W.

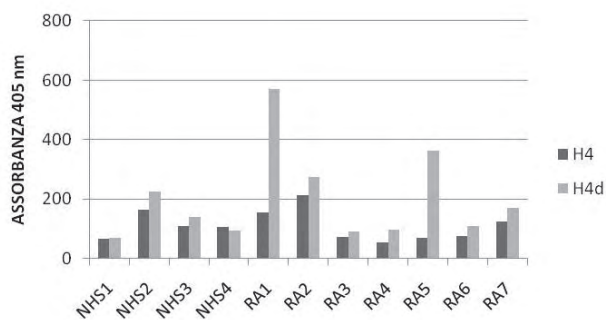


Fig 6b: NUNC

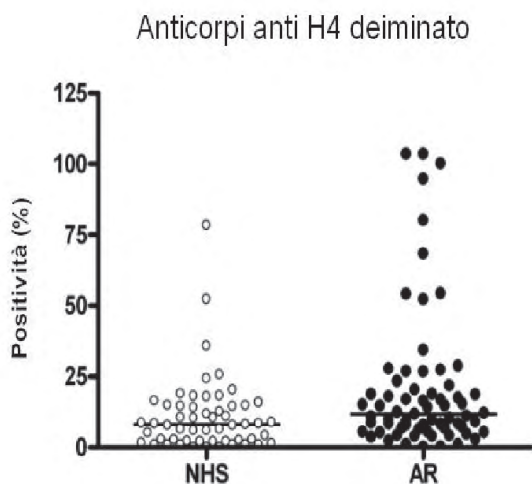


Fig 7: confronto tra NHS e AR

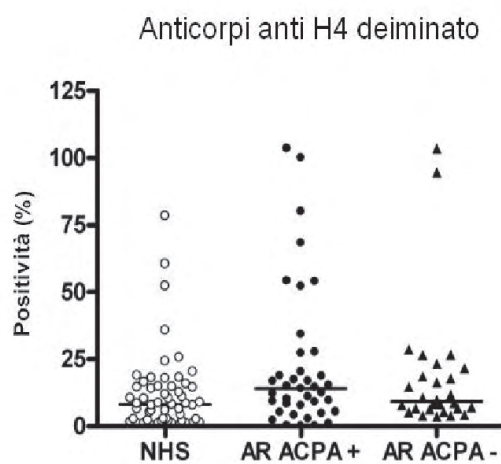


Fig 8: confronto tra NHS e AR ACPA+ e AR ACPA-

Anticorpi anti-H4 deiminato. Il protocollo messo a punto mediante le prove sopra descritte è stato utilizzato per ricercare anticorpi anti-H4 deiminato in 56 NHS e 67 AR. Come possiamo osservare dal grafico in figura 7, esiste una differenza statisticamente significativa ($p < 0.01$) tra la popolazione NHS e la popolazione AR. Suddividendo poi i pazienti con AR in ACPA+ e ACPA- osserviamo una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) tra la popolazione dei soggetti sani e le AR ACPA+ (figura 8). Nella popolazione di AR ACPA - sono però presenti pazienti che riconoscono l'H4 deiminato.

Il valore soglia per la definizione della positività all'H4 deiminato è stato posto al 97.5° percentile della popolazione dei soggetti sani. Utilizzando tale valore, anticorpi anti H4 deiminato sono rilevabili in 9/67 pazienti con AR (13% dei casi).

Dai risultati ottenuti finora si può dedurre che i pazienti con AR presentano anticorpi che reagiscono con sequenze deimate dell'istone H4 e che i soggetti di controllo reagiscono con l'istone; l'uso della molecola intera, seppur modificata in vitro, non sembra quindi essere la scelta migliore per un sistema diagnostico.

Abbiamo quindi cercato, all'interno dell'istone H4, delle sequenze ricche di arginina: ne abbiamo identificate 2 (H4 14-34 e 31-50) che ci sembravano particolarmente

interessanti e le abbiamo sintetizzate sostituendo tutte le arginine con citrulline. Tali peptidi, sintetizzati in forma lineare, sono stati utilizzati come substrato per analizzare 34 NHS e 97 sieri AR in test ELISA.

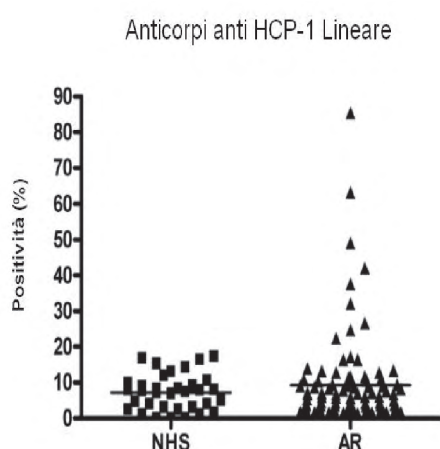


Fig. 9: Confronto tra NHS e AR.

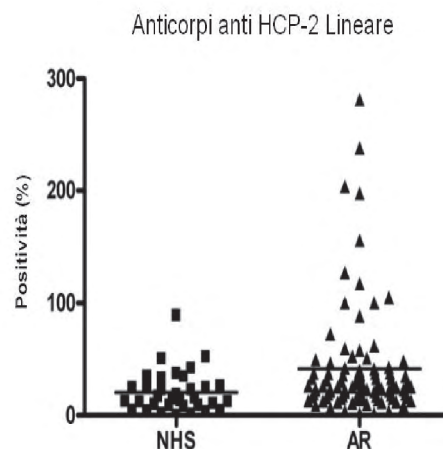


Fig. 10: Confronto tra NHS e AR.

Come possiamo osservare dal grafico in figura 9, non esiste una differenza statisticamente significativa ($p > 0.5$) tra la popolazione NHS e la popolazione AR quando utilizziamo come antigene HCP-1 lineare (H4cit 14-34). Osserviamo invece, una differenza statisticamente significativa ($p < 0.01$) tra la popolazione dei soggetti sani e le AR quando come antigene si utilizza HCP-2 (H4cit 31-50) lineare (figura 10).

Ponendo il cut-off al 97,5° percentile della popolazione dei soggetti sani sono stati rilevati anticorpi specifici per HCP-1 lineare e per HCP-2 lineare rispettivamente nel 10% e nel 13% dei sieri con AR.

Come si osserva dai grafici, esistono sieri di pazienti con AR con elevato titolo anticorpale contro entrambi i peptidi, anche HCP-1.

Entrambe le sequenze sono state allora sintetizzate come peptidi antigenici multipli (MAP), utilizzando un core di lisine che porta 4 peptidi lineari identici.

Tali peptidi sono stati utilizzati come antigene in tests ELISA nei quali abbiamo analizzato 48 NHS e 152 AR. Abbiamo analizzato anche 91 sieri di pazienti con malattie di controllo: 7 sieri di pazienti con Sclerodermia Sistemica (ScS), 12 sieri di pazienti con Crioglobulinemia Mista (CM), 48 sieri di pazienti con Lupus Eritematoso Sistemico (LES), 12 sieri di pazienti con Spondilite Anchilosante (SA), 12 sieri di pazienti con Artrite Psoriasica (AP).

Anticorpi anti HCP-1 MAP

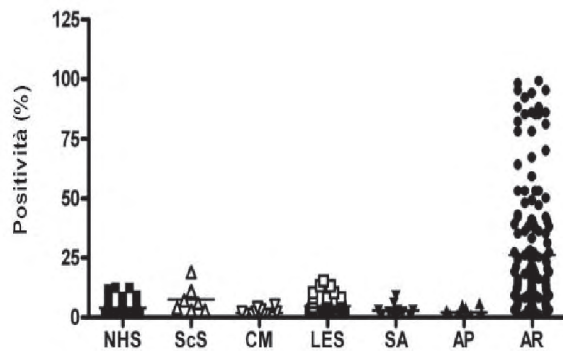


Fig 11: confronto tra NHS, malattie di controllo e AR.

Anticorpi anti HCP-2 MAP

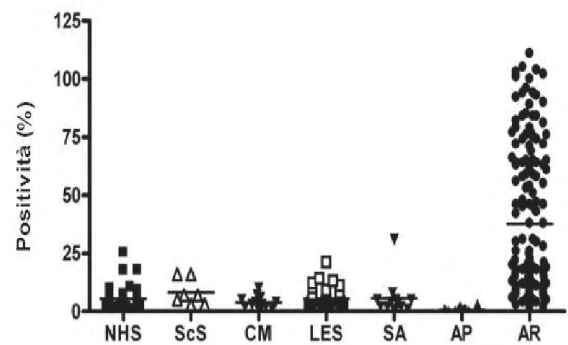


Fig 12: confronto tra NHS, malattie di controllo e AR.

Come possiamo osservare dal grafico in figura 11, esiste una differenza statisticamente significativa tra le varie popolazioni sia quando utilizziamo come antigene HCP-1 MAP ($p < 0.0001$) che quando utilizziamo come antigeni HCP-2 MAP ($p < 0.0001$) (figura 12). Per questa analisi statistica abbiamo utilizzato il test Kruskal-Wallis.

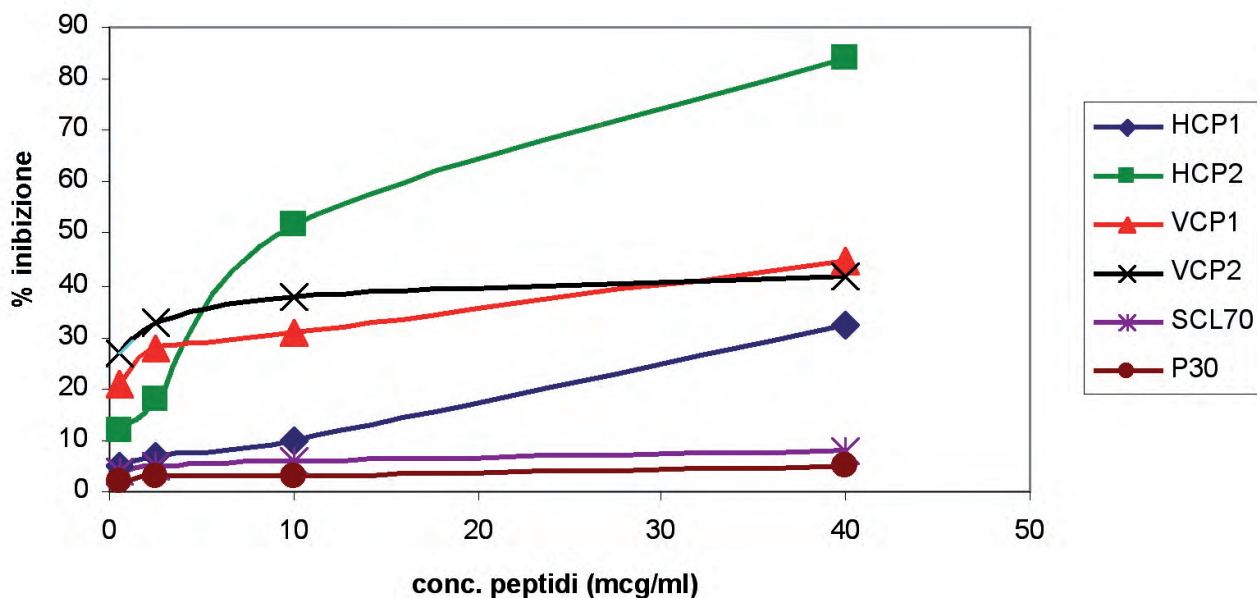
Ponendo il cut-off al 97,5° percentile della popolazione dei soggetti sani sono stati rilevati anticorpi specifici per HCP-1 MAP (H4cit 14-34) nel 67% dei sieri di AR e per HCP-2 MAP (H4cit 31-50) nel 63% dei sieri con AR, e in meno del 5% dei sieri di soggetti normali e di malattie di controllo per entrambi gli antigeni.

Come si evidenzia dai risultati ottenuti i test eseguiti con i MAP sono decisamente migliori rispetto ai lineari. I MAP (HCP-1 MAP e HCP-2 MAP) sono quindi ottimi antigeni per test su fase solida.

Nel corso dei nostri studi abbiamo potuto vedere che esistono sieri che reagiscono con un solo peptide e sieri reattivi con più peptidi: questo può dipendere dalla presenza nei sieri di popolazioni diverse di anticorpi, ciascuna reattiva con un peptide, oppure da popolazioni indipendenti di anticorpi, ciascuna reattiva con un solo peptide. Per distinguere fra queste possibilità, abbiamo purificato gli anticorpi anti peptidi citrullinati mediante cromatografia di affinità su colonne di Sefarosio cui sono stati coniugati due differenti peptidi citrullinati. La reattività di tali preparazioni è stata valutata con test ELISA basati sugli stessi antigeni utilizzati per la cromatografia: le preparazioni ottenute mostrano una reattività variabile ma generalmente elevata nei confronti dei peptidi citrullinati.

Gli anticorpi anti-HCP2 sono stati poi valutati mediante test di inibizione mediante pre incubazione con diversi peptidi citrullinati (Fig. 13).

test inibizione anti-HCP2 RaRo



Inibizione anti-HCP2 GaCa

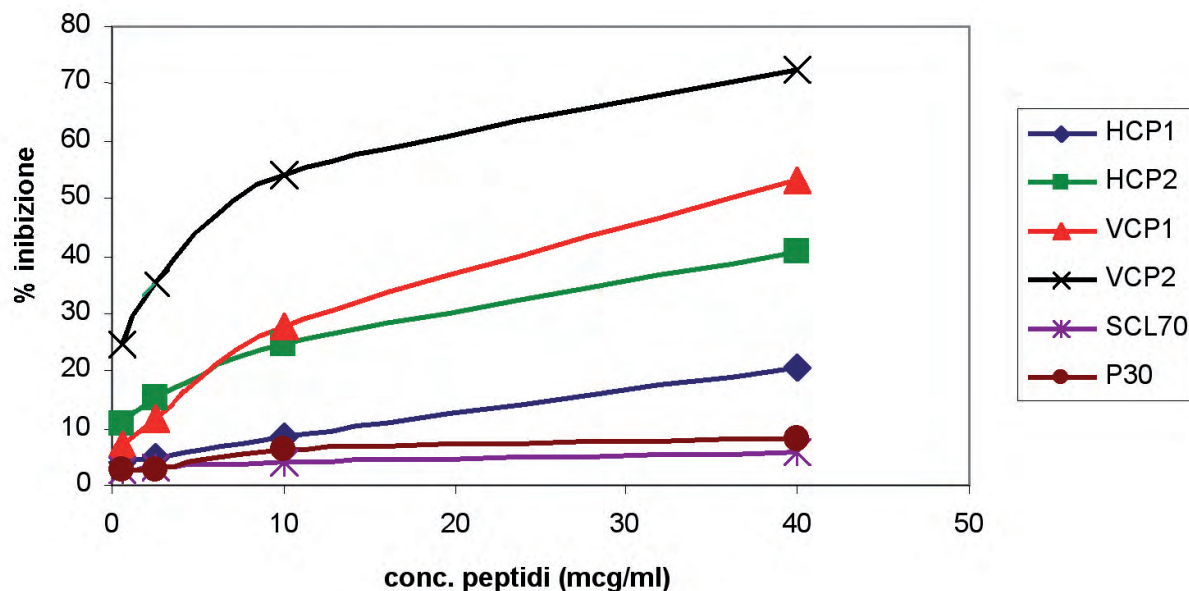


Fig. 13. Tests ELISA di inibizione di anticorpi anti-HCP2 di pazienti con RA da parte di peptidi citrullinati

I risultati ottenuti indicano che il peptide omologo (HCP2) è in grado di inibire quasi completamente il legame degli anticorpi alla fase solida. HCP1, VCP1 e VCP2 esercitano un'inibizione compresa fra il 30 e il 40%, suggestiva di cross-reattività degli anticorpi con le diverse sequenze citrullinate.

Discussione

I sieri dei pazienti con artrite reumatoide (AR) sono caratterizzati dalla presenza di anticorpi diretti verso proteine self di varia natura. Tra questi anticorpi ve ne sono alcuni che non sono malattia specifici come gli anti-RA33, gli anti-calpastatina, gli ANCA, gli ANA, gli anti-fibronectina, gli anti-collagene di tipo II e gli anti-GPI.

Il fattore reumatoide (FR), presente nei due terzi di pazienti con AR, anche se poco specifico, è tuttora utilizzato per la valutazione dell'AR. La presenza del FR non è sufficiente per effettuare diagnosi di AR, perché ha scarso valore predittivo, ma può essere importante per la prognosi dei pazienti, dato che la presenza di elevati livelli di FR si associa alle forme più gravi di malattia.

Quindi, la scarsa specificità di tutti gli anticorpi fin qui citati e, nel contempo, la necessità di un marcatore precoce di malattia, hanno reso necessaria la ricerca di anticorpi che, oltre a una buona sensibilità, avessero anche un'elevata specificità.

Tra gli autoanticorpi malattia-specifici ricordiamo gli anticorpi diretti verso la BiP e gli anticorpi anti proteine/peptidi citrullinati (ACPA).

Gli ACPA riconoscono particolari sequenze amminoacidiche in cui le arginine della proteina nativa vengono sostituite dalla citrullina (amminoacido non naturale) attraverso una reazione enzimatica catalizzata dalla peptidil-arginin-deiminasi (PAD).

Molti studi hanno dimostrato che i sieri dei pazienti con AR contengono anticorpi che riconoscono diverse proteine citrullinate tra le quali la filaggrina, il collagene II (CII) [Burkhardt et Al., 2005], la fibrina/fibrinogeno [Masson-Bessiere et Al., 2001], la fibronectina [Chang et Al., 2005], la vimentina (antigene target degli anticorpi anti-Sa) [Vossenaar et Al., 2004 (a)], l' α -enolasi [Kinloch et Al., 2005], l'EBNA 1 (antigene nucleare dell'*Epstein-Barr Virus*) [Anzilotti et Al., 2006] e peptidi da esso derivati (VCP-1) [Pratesi et Al., 2006].

Queste proteine, riconosciute dai sieri dei pazienti con AR, hanno in comune, nella loro sequenza amminoacidica, delle arginine fiancheggiate da aminoacidi piccoli e neutri come la glicina, la serina o la treonina. Gli istoni sono proteine ricche di arginine che, in certe parti della loro sequenza, sono fiancheggiate appunto da tali aminoacidi: dal punto di vista biochimico, hanno quindi le caratteristiche tipiche per essere riconosciute dagli ACPA.

La sinovia di pazienti con AR contiene molte cellule infiltranti tra cui i granulociti sono sicuramente i più numerosi. Nei granulociti, a seguito di eventi di attivazione, la PAD citosolica (isoforma 4) può traslocare nel nucleo e deiminare differenti proteine [Nakashima et Al., 2002]. I substrati nucleari individuati comprendono gli istoni H2A, H3 e H4, nonché la nucleofosmina/B23 [Hagiwara et Al., 2002]: gli istoni sono quindi proteine deimate in condizioni fisiologiche. Da esperimenti fatti nel nostro laboratorio abbiamo potuto constatare che l'istone H4 deimato è quello che meglio discrimina

tra sieri di pazienti con AR e sieri normali. Inoltre studi effettuati in precedenza dal nostro gruppo di lavoro su istoni purificati da nuclei di granulociti attivati con un calcio ionoforo hanno mostrato che l'H2A, l'H3 e l'H4 erano deiminati ma che solo l'H4 deiminato era riconosciuto dai sieri dei pazienti con AR.

In questo lavoro abbiamo quindi voluto vedere se nel siero dei pazienti con AR ci sono ACPA in grado di riconoscere l'istone H4 deiminato. Dopodiché abbiamo esaminato nel dettaglio le caratteristiche degli anticorpi specifici per i peptidi derivati dagli istoni. In un primo momento abbiamo effettuato un Dot Blot dove sono stati utilizzati 2 antigeni, l'H4 e l'H4 deiminato, ma dai risultati è emerso che anche i sieri normali riconoscevano l'istone H4 deiminato, seppur in misura inferiore ai sieri di AR. Questo ci ha fatto ipotizzare che sicuramente c'è una differenza tra le due popolazioni ma che con il dot blot non viene messa in particolare evidenza.

Abbiamo perciò cercato di sviluppare un test ELISA per misurare gli anticorpi anti H4 deiminato definendo le condizioni ottimali del test; la messa a punto di questo test è stata particolarmente indaginosa, probabilmente per l'elevata carica positiva delle proteine coinvolte. Gli istoni hanno infatti un punto isoelettrico superiore a 10: questa carica può facilitare interazioni elettrostatiche con altre proteine, come per esempio quelle utilizzate per bloccare o con gli anticorpi sierici.

La reattività dei sieri normali può dipendere in parte da interazioni elettrostatiche "aspecifiche". Per ovviare a questo abbiamo usato concentrazioni elevate di sale: nonostante questo, dai risultati ottenuti, si può dedurre che sia i sieri dei pazienti con AR che quelli di controllo presentano anticorpi che reagiscono con sequenze deiminate dell'istone H4. Questo può dipendere dal fatto che i sieri dei pazienti con AR riconoscono sequenze diverse all'interno della molecola rispetto ai sieri normali: l'uso della molecola intera deiminata non sarebbe in questo caso la scelta migliore per un sistema diagnostico.

Abbiamo quindi identificato, all'interno dell'istone H4, delle sequenze particolarmente ricche di arginine, e le abbiamo sintetizzate sostituendo le arginine con le citrulline. In particolare abbiamo studiato le sequenze H4 14-34 (peptide HCP-1) e 31-50 (peptide HCP-2).

Quando usiamo questi peptidi nella loro forma lineare come antigene nel test ELISA possiamo vedere che esiste una differenza statisticamente significativa tra sieri AR e NHS solo con HCP-2. Quando invece vengono utilizzati i MAP (peptidi antigenici multipli) derivati da HCP-1 e da HCP-2 possiamo discriminare i sieri di AR dai controlli sani e dai sieri di altre malattie con entrambi i peptidi.

Un altro vantaggio dei peptidi sintetici citrullinati rispetto alla proteina deiminata in vitro è la possibilità di ottenere un prodotto chimicamente ben definito. La deiminazione in vitro di una proteina con la PAD può generare molecole proteiche con un variabile grado di deiminazione e inoltre, per questo motivo, preparazioni diverse possono dare performance diverse. Il processo di sintesi porta invece a molecole di strutture ben definite ed è assolutamente riproducibile.

Come spesso osservato, i peptidi in forma ramificata sono antigeni migliori dei lineari. Questa loro caratteristica è probabilmente legata a una maggiore solubilità, a una più

alta capacità di legarsi alla fase solida ma, soprattutto, a una migliore esposizione delle sequenze.

I dati ottenuti dimostrano che anticorpi anti-istoni deiminati sono presenti nei sieri di pazienti con AR.

È inoltre interessante notare che i sieri di LES, che contengono anticorpi anti-istoni, non reagiscono con le sequenze in cui l'arginina è sostituita da citrullina. La reattività con questi peptidi si associa alla presenza di fattore reumatoide; inoltre, i titoli anticorpali sono correlati a quelli ottenuti con altri metodi per misurare ACPA. Quindi i peptidi citrullinati derivati dagli istoni misurano anticorpi appartenenti alla famiglia degli ACPA e HCP1 e HCP2 possono essere utilizzati in un test diagnostico di elevata specificità e buona sensibilità. La sovrapposizione solo parziale tra i risultati ottenuti con peptidi diversi fa sì che l'uso combinato di questi test incrementi notevolmente la possibilità di fare diagnosi sierologica di AR.

E' quindi ipotizzabile in futuro lo sviluppo di metodi analitici di tipo multiplex, in cui siano utilizzati insieme tutti questi peptidi, per ottenere la massima sensibilità diagnostica.

L'analisi della specificità degli anticorpi anti-peptidi citrullinati istonici, condotta su anticorpi purificati per cromatografia di affinità sul peptide, ha evidenziato come gli anticorpi abbiano un'elevata affinità per il peptide omologo, ma siano cross-reattivi con altre sequenze citrullinate, anche derivate da proteine diverse. Risultati analoghi sono stati ottenuti da altri autori studiando altre proteine citrullinate come il fibrinogeno o la filaggrina, o anticorpi purificati dai peptidi adesi alla fase solida nel test CCP.

In definitiva, tutti i risultati ottenuti nel nostro studio ci fanno concludere che anche gli anticorpi anti-HCP1 e anti-HCP2 appartengono alla famiglia degli ACPA.

CAPITOLO 3

I granulociti nell'artrite reumatoide

I NETs: neutrophil extracellular traps

I neutrofili, chiamati anche leucociti polimorfonucleati (PMN) in virtù del loro nucleo multilobato e morfologicamente variabile, sono cellule altamente specializzate che appartengono agli effettori dell'immunità innata. Hanno il compito di uccidere gli agenti patogeni mediante la fagocitosi, la degranolazione di enzimi e peptidi ad azione antimicrobica e la generazione di specie reattive dell'ossigeno. Tali cellule hanno attività verso batteri, virus e funghi. Se questi meccanismi di difesa si alterano e l'attività dei PMN non è più adeguatamente regolata queste cellule diventano mediatori di infiammazione e danno tissutale.

A causa proprio di queste loro caratteristiche i PMN sono chiamati in causa nelle patologie autoimmuni.

È stato recentemente dimostrato che i neutrofili, in risposta a diversi stimoli (per esempio microorganismi patogeni o infiammazione), rilasciano proteine dei granuli e cromatina che, insieme, formano i NETs (neutrophil extracellular traps), cioè fibre extracellulari che intrappolano batteri Gram positivi e Gram negativi [Brinkmann et Al., 2004; Beiter et Al., 2006; Buchanan et Al., 2006; Fuchs et Al., 2007]. I granulociti neutrofili nel formare i NETs vanno incontro a una morte cellulare che dipende dalla generazione di specie reattive dell'ossigeno da parte di NADPH e che è distinta sia dalla necrosi che dall'apoptosi [Fuchs et Al., 2007]. I NETs appartengono all'immunità innata: hanno lo scopo di catturare i microorganismi e di prevenire la loro diffusione, determinando un'elevata concentrazione locale (proprio dove il microorganismo è imprigionato) di agenti antimicrobici.

I NETs possono essere anche prodotti *in vitro*, a seguito di diversi stimoli: interleuchina 8 (IL-8), PMA (estere del forbolo), lipopolisaccaride (LPS), TNF, acqua ossigenata (H_2O_2). I NETs sono abbondanti nelle sedi di infiammazione: il DNA è il loro principale costituente, ma contengono, tra l'altro, tutte e cinque le proteine istoniche (H1, H2A, H2B, H3 e H4) [Brinkmann et Al., 2004] e varie proteine dei granuli azzurrofilo (elastasi, catepsina G, mieloperossidasi), dei granuli specifici (lattoferrina) e dei granuli terziari (gelatinasi).

Dalla letteratura sappiamo che la PAD4 è abbondante nei granuli citoplasmatici dei granulociti eosinofili e neutrofili [Asaga et Al., 2001; Nakashima et Al., 2002; Su et Al., 2004]: questo suggerisce che la deiminazione in generale svolga un ruolo importante nella risposta dei granulociti all'infiammazione. In effetti istoni deiminati sono stati identificati nei NETs, in particolare l'H3 [Neeli et Al., 2008; Wang et Al., 2009] e l'H4 [Wang et Al., 2009]: elevati livelli di deiminazione negli istoni sono associati alla decondensazione della cromatina e proprio la decondensazione della cromatina mediata dalla deiminazione degli istoni sta alla base della successiva formazione dei NETs. Dalla letteratura è altresì noto che diverse citochine e segnali extracellulari

come TNF, LPS e H₂O₂ inducono citrullinazione degli istoni e decondensazione della cromatina nei neutrofili [Neeli et Al., 2008; Wang et Al., 2009].

La produzione di NETs, tuttavia, non ha solo effetti positivi sugli agenti invasori, ma può anche essere dannosa per l'individuo: l'esposizione extracellulare di complessi istonici può essere importante nello sviluppo di malattie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico [Hakkim et Al., 2010]. Nelle vasculiti ANCA-positive, i NETs sono stati dimostrati nelle lesioni glomerulari ed è stato ipotizzato che i neutrofili danneggino l'endotelio proprio attraverso la formazione di NETs [Kessenbrock et Al., 2009].

La produzione di istoni deiminati in corso di infezione o a causa della persistente attivazione dei neutrofili può inoltre fornire lo stimolo iniziale per la risposta autoimmune a proteine deimate.

Scopo del lavoro

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare la risposta anticorpale dei sieri di pazienti con AR a proteine deimate in vivo, focalizzando la nostra attenzione sugli istoni deiminati prodotti nei granulociti a seguito di stimoli infiammatori e presenti nei NETs.

Materiali e metodi

Purificazione degli ACPA e delle IgG normali. I sieri di soggetti normali e di pazienti con AR, vengono sottoposti a precipitazione in solfato di ammonio saturo al 50%; il precipitato (arricchito di immunoglobuline IgG) viene risospeso in PBS pH 7,4 e dializzato overnight contro PBS, quindi incubato su colonna di Sefaroso-proteina A. Dopo estensivi lavaggi con PBS, gli anticorpi legati alla colonna vengono eluiti con glicina 0,1M pH 2,8, immediatamente neutralizzati con 1:10 v/v Tris 1M pH 8,0 e dializzati overnight contro PBS. Si ottengono così IgG da soggetti normali (NH IgG) e da pazienti con AR (AR IgG).

Gli ACPA sono ottenuti da sieri di pazienti con AR mediante cromatografia di affinità su una colonna di peptide deimato (VCP) accoppiato a sepharose.

Isolamento dei polimorfonucleati. I PMN vengono purificati a temperatura ambiente da 20 ml di sangue intero prelevato a donatori sani. E' preferibile lavorare con un pool di granulociti ottenuti da diversi donatori per ridurre la variabilità che esiste tra un soggetto e l'altro. Il campione di sangue con anticoagulante (eparina) viene diluito 1:2 in D-PBS (KCl 3 mM, KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8 mM), stratificato su Ficoll-Paque (Amersham) e centrifugato a 500g per 30 minuti a RT. Si ottiene una stratificazione del materiale per gradiente di densità. Il pellet degli eritrociti e dei granulociti viene trattato con incubazioni ripetute in una soluzione emolisante (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0,1 mM), fino a quando il pellet dei granulociti non risulti pulito dagli eritrociti.

Stimolazione dei PMN e estrazione acida degli istoni.

I granulociti sono stati incubati con A23187 4 $\mu\text{g/ml}$ (un calcio ionoforo) o lasciate non trattate con D-PBS contenente 0,1% glucosio, 0,5% siero fetale inattivato al calore e 2 mM di CaCl_2 alla densità di 10^7 cellule/ml, in piastre per colture cellulari da 12 pozzetti. Lo stimolo è stato applicato per 15 minuti a 37 °C, le cellule sono state lavate con D-PBS e re-incubate in RPMI FCS 10% per 1 ora a 37 °C.

Dopo tre ulteriori lavaggi in D-PBS, le cellule sono state risospese in H_2SO_4 0,2 N e sottoposte a lisi mediante sonicazione. Il lisato acido così ottenuto è stato incubato per 12 ore a +4 °C. Al termine di tale periodo di incubazione, il lisato è stato centrifugato a 15000g per 15 minuti a +4 °C. Il pellet di proteine acido-insolubili è stato eliminato, mentre il surnatante arricchito in proteine acido solubili (tra cui gli istoni) è stato sottoposto a precipitazione con acido tricloro acetico seguendo protocolli standard e risospese in tampone per la corsa elettroforetica oppure in H_2O .

Stimolazione dei PMN e purificazione dei NETs. I granulociti sono stati incubati con TNFalfa 2 ng/ml, H_2O_2 100 μM , LPS 100 ng/ml, PMA 20 nM, A23187 4 $\mu\text{g/ml}$ (un calcio ionoforo) o lasciate non trattate con D-PBS contenente 0,1% glucosio, 0,5% siero fetale inattivato al calore e 2 mM di CaCl_2 alla densità di 10^7 cellule/ml, in piastre per colture cellulari da 12 pozzetti. Lo stimolo è stato applicato per 4 ore a 37 °C. Le proteine contenute nei NETs sono state purificate secondo la metodica descritta da Urban e coll. con qualche modifica [Urban et Al., 2009]. In particolare: ogni pozzetto è stato lavato 2 volte, dopo aver rimosso il surnatante, con 1ml di D-PBS. Ogni lavaggio viene incubato per 10 minuti a 37 °C. Lo scopo dei lavaggi è quello di rimuovere i prodotti della de granulazione liberati nel surnatante e non fisicamente adesi ai NETs, che essendo ancorati alla cellula per mezzo della cromatina, non vengono eliminati con questo trattamento. I NETs vengono poi digeriti per 20 minuti in 1 ml di D-PBS con 40 U/ml di DNase-1: questo trattamento distrugge la cromatina e permette la liberazione delle proteine che formano i NETs. La reazione della DNase-1 viene fermata chelando il calcio, quindi aggiungendo al pozzetto EDTA 5 mM. I campioni vengono centrifugati a 300xg per eliminare le cellule intere e a 16000xg per eliminare i detriti. Le proteine vengono quindi precipitate con acido tricloroacetico (TCA) al 33% seguendo protocolli standard e risospese nel tampone per la separazione con gel di acrilamide.

Determinazione della concentrazione proteica. La concentrazione proteica dei campioni è stata valutata con il metodo BCA (acido bicinoninico): in condizioni alcaline gli ioni Cu^{2+} formano un complesso con i legami peptidici delle proteine e vengono così ridotti a Cu^+ . L'acido bicinoninico, in ambiente alcalino, è un reagente altamente stabile, sensibile e specifico per il Cu^+ e forma con esso un composto color porpora la cui intensità è proporzionale alla quantità di proteina presente. La variazione di intensità si misura come variazione di assorbanza a 562 nm facendo riferimento a una curva standard ottenuta con concentrazioni note di BSA (albumina di siero bovino).

Elettroforesi SDS-PAGE. Le proteine ottenute dai NETs vengono risospese nel “Laemmli sample buffer” (LSB) (Tris HCl 0,25 M pH 6,8, SDS 20%, glicerolo 10%, blu di bromofenolo 0.001%). I campioni e i marcatori di peso molecolare vengono posti a 100 °C per 5 minuti per favorire l’azione dell’SDS e raffreddati prima di essere caricati sul gel. L’SDS è un detergente fortemente anionico e si lega con una molecola ogni due residui aminoacidici, conferendo alla proteina una carica netta negativa: in questo modo le proteine tendono ad avere lo stesso rapporto carica-massa e la stessa forma e la separazione elettroforetica avverrà solo sulla base della loro massa. Il peso molecolare può essere determinato comparando la mobilità elettroforetica della proteina in esame con la mobilità di proteine note usate come marcatore: il logaritmo del peso molecolare è linearmente correlato con la mobilità relativa.

La densità delle maglie del gel varia a seconda delle concentrazioni di acrilamide e del rapporto tra il monomero e il suo dimero (bisacrilamide) che al momento della polimerizzazione formano dei legami trasversali. Per separare le nostre proteine abbiamo usato un gel di poliacrilamide al 20%: il gel è costituito dallo stacking gel e dal separating gel. Il primo serve a compattare le proteine del campione e la sua composizione in acrilamide e bisacrilamide è sempre uguale; il secondo, le cui maglie variano a seconda del tipo di proteine da separare, è il vero gel di separazione.

Western blot e immunoblot. Dopo l’elettroforesi le proteine vengono trasferite dal gel al PVDF tramite Western blotting. Il PVDF è una membrana idrofobica ad elevato potere di binding (Hybond TM-P, Amersham, Little Chalfont, UK), che deve essere viene bagnato con metanolo per 15-20 secondi, lavato con acqua e incubato con il tampone di trasferimento (blotting buffer: Tris 0.05M, glicina 0.04M, metanolo 20%) fino al suo utilizzo; quindi viene messo a contatto con il gel nel blotting buffer. Viene quindi fatta una seconda elettroforesi perpendicolare al gel (50 mA costanti per 4-5 ore).

Al termine del trasferimento, il foglio di PVDF viene bloccato con TBS, caseina 2%, Tween-20 0,05% per 30 minuti a temperatura ambiente, per saturare i siti liberi. Strisce di PVDF corrispondenti a un lane sono incubate con sieri di soggetti sani (NHS) e di soggetti con AR diluiti 1:100 in TBS, caseina 2%, Tween-20 0,05%, NaCl 0,5 M per 3 ore a temperatura ambiente (RT); altre strisce vengono invece bloccate con TBS, BSA 5%, Tween-20 0,05% e successivamente incubate con antisieri di coniglio diretti contro le proteine istoniche, native o deimate, diluiti nello stesso tampone di blocco alla concentrazione suggerita dalla ditta produttrice. Al termine del periodo di incubazione vengono fatti 3 lavaggi con T-TBS (TBS, 0,1% Tween). Le strisce sono poi incubate, per 3 ore a temperatura ambiente, con un anticorpo secondario marcato con perossidasi di rafano (HRP) e diluito in T-TBS (1:35000 nel caso dell’anti-human IgG HRP; 1:3000 nel caso dell’anti-rabbit IgG-HRP). Al termine dell’incubazione vengono effettuati 5 lavaggi con T-TBS e si procede allo sviluppo in chemiluminescenza usando un substrato molto sensibile, il SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). L’immagine è stata acquisita e analizzata usando il VersaDoc Imaging System e il Quantity One analysis software (Biorad Laboratoire, Hercules, CA).

Elettroforesi bidimensionale. Per la risoluzione fine degli istoni è stata utilizzata una elettroforesi bidimensionale secondo il metodo descritto da Dimitrov e Wolffe [Dimitrov et Wolffe, 1997] con qualche modifica: nella prima dimensione gli istoni sono separati in base alla loro carica mediante un gel di urea acida, nella seconda dimensione invece, la separazione avviene in base alla carica proteica e all'affinità per detergenti non ionici mediante un gel di urea acida e Triton X-100. In questo modo, grazie al fatto che piccole differenze nell'idrofobicità degli istoni risultano in una differente mobilità nel gel contenente detergenti non ionici, è possibile ottenere una separazione delle isoforme degli istoni, non ottenibile con un semplice SDS-page.

Per la corsa nella prima dimensione le proteine isolate dai NETs sono risospese in urea 8 M, acido acetico 1 M, β -mercaptoetanololo 1 M, e vengono separati in un gel verticale di 16/18 cm contenente acrilamide 15%, urea 7 M, acido acetico 0,9 M. È stata fatta una precorsa del gel (con il solo tampone di corsa) per 4 ore a 25 mA per eliminare dal gel eventuali impurità residue, quindi le proteine vengono separate per 12-15 ore a 50 V costanti in Running Buffer (0.9 M acido acetico).

Nella seconda dimensione le proteine vengono separate in un gel verticale costituito da un concentrating gel di 2-3 cm (acrilamide 15%, urea 6 M, acido acetico 0,9 M) e da un running gel di 15-16 cm (acrilamide 15%, urea 7 M, acido acetico 0,9 M Triton X-100 0,4%). La corsa è effettuata in acido acetico 5,7%, glicina 0,75% a 20 mA overnight. Al termine della separazione elettroforetica, le proteine vengono trasferite su PVDF mediante Western Blotting in acido acetico 0,7%, metanolo 10%. Il foglio di PVDF viene saturato con TBS, BSA 5%, Tween-20 0,05% per 1 ora a temperatura ambiente. Come primo anticorpo vengono usate immunoglobuline di soggetti normali o anti-VCP diluiti a 20 μ g/mL, anti-H3(deiminato e non) o anti-H4 (deiminato e non) diluiti 1:500 in TBS BSA 5%, Tween 0,5%; gli anticorpi sono incubati per 2 ore in agitazione a RT. Dopo 3 lavaggi con T-TBS (TBS 1X Tween 0,1%), viene incubato il secondo anticorpo (anti Human-IgG-HRP 1:30000 o anti rabbit-HRP 1:3000 in T-TBS) e incubato per 3 ore a RT. Dopo ulteriori lavaggi, si sviluppa in chemiluminescenza con acquisizione dell'immagine al VersaDoc.

Risultati

Dalla letteratura è noto che i granulociti neutrofili, a seguito di determinati stimoli, esprimono istoni deiminati. E' noto inoltre che tali cellule possono produrre i NETs e che questi contengono istoni e, soprattutto, istoni deiminati. In questo studio abbiamo voluto verificare se i sieri di pazienti con AR sono in grado di reagire con gli istoni contenuti nei NETs prodotti dai PMN.

In primo luogo abbiamo analizzato un estratto di granulociti, prima di analizzare i NET. I granulociti ottenuti da sangue periferico sono stati sottoposti a stimolazione con calcio ionoforo e sono stati poi isolati i nuclei, che sono stati sottoposti a precipitazione acida. La frazione acido-solubile è fortemente arricchita in proteine istoniche.

Nel tentativo di distinguere isoforme di proteine istoniche caratterizzate da modifiche post-traduzionali differenti (o di differente entità), la frazione acido-solubile è stata

separata mediante elettroforesi bidimensionale su gel di urea acida e Triton X-100. Questo tipo di separazione non ha dato però risultati accettabili.....(Fig 14)

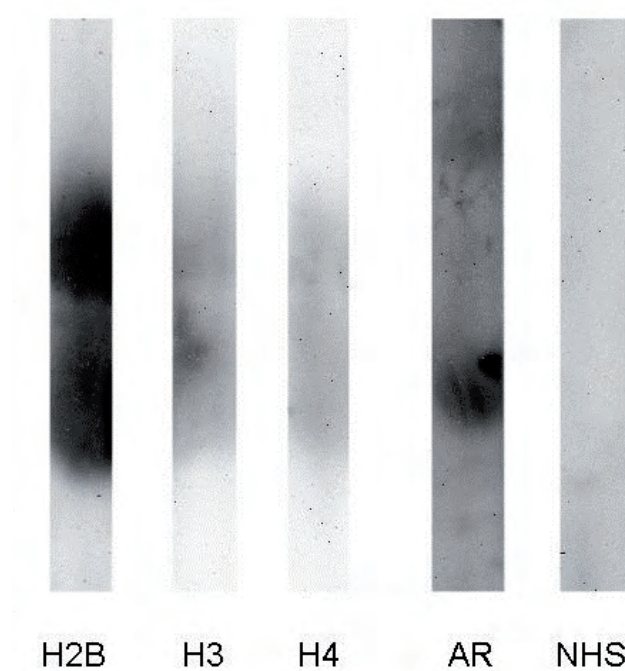


Fig 14. Immunoblot su gel di elettroforesi bidimensionale.
Prima dimensione urea acida, seconda dimensione urea acida e Triton X-100
AR: siero di pazienti affetti, NHS: siero di controlli sani
Campione proteico: estratto nucleare acido solubile di granulociti attivati

Abbiamo allora fatto ricorso alla separazione su SDS-PAGE, utilizzando un gel a maglie particolarmente strette (20% acrilammide) per riuscire a separare proteine di basso peso molecolare come gli istoni. Questa separazione fornisce risultati migliori (vedi Fig 15) ma non consente di discriminare isoforme della stessa proteina che differiscano per carica.

Trasferiti su PVDF, gli estratti acidi nucleari (da granulociti attivati e non attivati) sono stati incubati con sieri di pazienti e controlli (Fig. 15): i risultati indicano chiaramente che i sieri di pazienti con AR contengono anticorpi diretti contro una proteina a peso molecolare compatibile con quello dell'H4 e che tale reattività è specifica per la proteina contenuta nell'estratto di granulociti stimolati con calcio ionoforo, quelli cioè in cui è stata indotta deiminazione

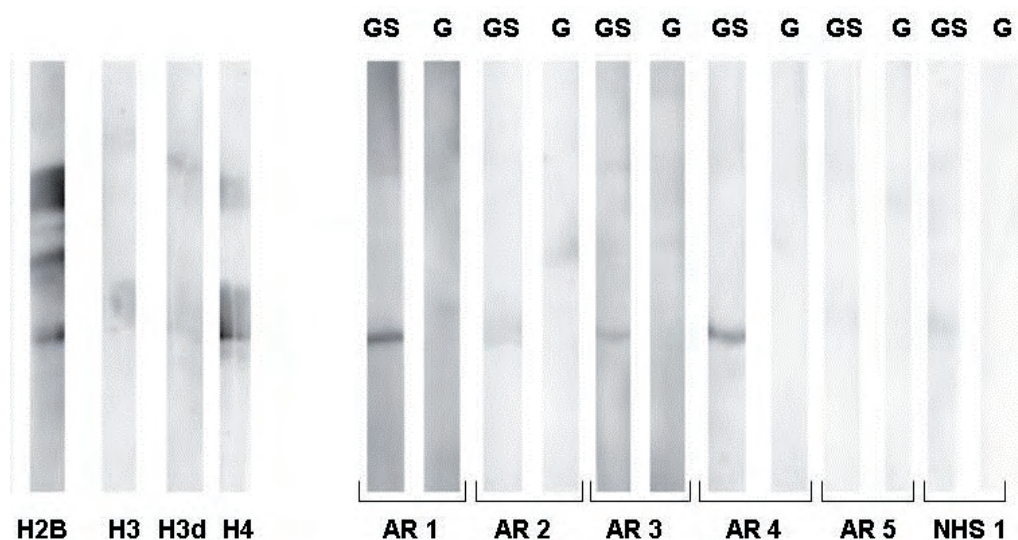


Fig 15. Immunoblot su gel SDS-PAGE 20% AR1-4: sieri di pazienti affetti da AR aCPA positive. AR5: siero di paziente affetto da AR ACPA negativa. NHS: siero di controllo sano
Campione proteico: estratto nucleare acido solubile di granulociti attivati

Alla luce di tali risultati abbiamo preso in considerazione i NET. Abbiamo quindi esaminato diversi tipi di stimolo capaci di indurre la formazione di NETs nei granulociti neutrofilo: la PMA, il calcio ionoforo A23187, ma anche sostanze più fisiologiche come il lipopolisaccaride (per mimare un'infezione), l' H_2O_2 , (per mimare le condizioni di stress ossidativo che si verificano nel tessuto sinoviale dei soggetti con artrite reumatoide) e il TNFalfa (una citochina ad azione pro infiammatoria). I nostri esperimenti confermano quanto già descritto in letteratura e cioè che stimoli differenti inducono NETs qualitativamente e quantitativamente diversi. Per il nostro studio abbiamo deciso di usare come stimolo sia la PMA che l' H_2O_2 perché inducevano una maggior quantità di H3 e H4 deiminato.

Dopo aver isolato le proteine contenute nei NETs le abbiamo separate mediante SDS PAGE e trasferite su PVDF. I blot così ottenuti sono stati incubati con i vari anticorpi anti-istoni deiminati e non: come mostrato nella figura 15, i NET li contengono entrambi. I blot con le proteine derivate dai NETs sono stati quindi incubati con alcuni sieri normali e con alcuni sieri di pazienti affetti da AR. Abbiamo fatto dei test preliminari per stabilire le condizioni migliori di reazione dei sieri (Tab. 2).

BLOCCO	TBS BSA 5% Tw0,05%	TBS latte 5%	TBS gel. 2%	TBS caseina 2% Tw 0,05%
SIERI/AB	TBS BSA 5% Tw0,05%	TBS FCS 5% Tw 0,05%	TBS gel. 1% Tw 0,05%	TBS caseina 2% Tw 0,05%

Tab. 2. Tamponi utilizzati nel blot.

I sieri sono stati diluiti a diverse concentrazioni (1:100, 1:500 e 1:1000) e con NaCl (0,5 e 1M) e senza NaCl. L'NaCl e il Tween-20 nei tamponi di diluizione hanno lo scopo di diminuire il legame aspecifico degli anticorpi.

I risultati migliori si ottengono con la caseina e con l'NaCl 0,5M: in queste condizioni

i sieri di AR legavano una proteina di peso molecolare simile all'istone H4 deiminato. Tuttavia questi blot mostravano un elevato background. Per ottenere una reattività più netta abbiamo deciso di purificare le IgG dai sieri positivi all'immunoblot e dai sieri normali di controllo. Come per i sieri abbiamo fatto dei test preliminari per stabilire le condizioni migliori di reazione delle preparazioni di Ig (Tab. 2). Le Ig sono state diluite a 20 e 50 µg/ml. I risultati migliori si ottenevano anche in questo caso con la caseina e con l'NaCl 0,5M: i blot incubati in queste condizioni con le preparazioni di IgG ottenute dai sieri dei pazienti con AR mostravano una banda dello stesso peso dell'H4 deiminato.

Per confermare che la banda evidenziata da questi sieri è realmente H4 deiminato sono in corso esperimenti di immunoprecipitazione utilizzando Ig totali purificate dai sieri positivi su immunoblot. La quantità di H4 deiminato nelle preparazioni di NETs è veramente molto bassa (dai nostri blot possiamo vedere che la banda evidenziata dall'anticorpo anti-H4 deiminato è nettamente meno intensa di quella evidenziata dall'anticorpo anti-H2B). Per questo motivo, gli esperimenti di immunoprecipitazione in corso sono condotti su un estratto acido dei PMN stimolati con A23187, che contengono una quantità di istoni deiminati maggiore dei NET.

Discussione

I sieri dei pazienti con AR possiedono anticorpi specifici verso diverse proteine deimate sia self che non self (fillaggrina, fibrinogeno, enolasi, vimentina, collagene I e II, EBNA I) alcune delle quali non sono presenti nella sinovia. Gli anticorpi specifici per l'artrite reumatoide, che riconoscono queste proteine deimate, rappresentano una famiglia di anticorpi con specificità sovrapposte che possono essere collettivamente chiamati anticorpi anti-proteine/peptidi citrullinati (ACPA). Tuttora non sappiamo quale sia il *primum movens* che fa scattare la produzione di tali anticorpi.

Le proteine riconosciute dagli ACPA hanno in comune, nella loro sequenza aminoacidica, delle arginine fiancheggiate da aminoacidi piccoli e neutri come la glicina, la serina o la treonina. Gli istoni sono delle proteine ricche di arginine, e, in certe parti della loro sequenza, sono fiancheggiate appunto da tali aminoacidi. Dalla letteratura sappiamo che gli istoni sono fisiologicamente deiminati/citrullinati e che tale modificazione rappresenta un meccanismo di regolazione genica. Infatti sembra che la deiminazione delle proteine istoniche da parte delle PAD possa antagonizzare l'induzione alla trascrizione genica, processo promosso invece dalla metilazione delle arginine [Cuthbert et Al., 2004]. Inoltre è stato dimostrato, in esperimenti su granulociti, che la ipercitrullinazione delle proteine istoniche a opera della PAD4, determina una decondensazione della cromatina nucleare e promuove la formazione delle neutrophil extracellular traps (NETs) [Wang et Al., 2009].

Precedenti esperimenti eseguiti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che gli anticorpi dei pazienti con AR riconoscono l'H4 estratto dai nuclei dei granulociti trattati con un calcio ionoforo: tale H4 era deiminato. A partire da questa evidenza abbiamo sviluppato un test ELISA per la ricerca degli ACPA basato su peptidi derivati dall'istone H4 deiminato.

Abbiamo quindi ipotizzato che questi stessi anticorpi potessero riconoscere l'H4 in vivo: per fare questo, l'anticorpo, dovrebbe essere in grado di entrare nella cellula viva e funzionale. Anche se ci sono esempi in letteratura di anticorpi con queste caratteristiche [Yanase et Al., 1997] i dati al riguardo non sono conclusivi e comunque è raro trovare anticorpi che abbiano la capacità di entrare nella cellula e nel nucleo.

Durante l'apoptosi, per esempio, la PAD si attiva e potrebbe deiminare, tra le altre, le proteine istoniche e, con il progredire del processo apoptotico, gli istoni potrebbero venire a trovarsi nello spazio extracellulare, sia come nucleosomi che come istoni liberi. Al di fuori dell'apoptosi, comunque, i granulociti si attivano in risposta a diversi stimoli, per esempio dopo esser venuti in contatto con agenti virali o batterici: è proprio in questo contesto che è stata dimostrata la formazione dei NETs, costituiti da cromatina nucleare e istoni [Brinkmann et Al., 2004].

Nei NETs gli istoni sono disponibili nell'ambiente extracellulare, in sede di infiammazione e, inoltre, H3 e H4 sono deiminati: potrebbero rappresentare quindi un bersaglio facilmente accessibile per gli anticorpi dei pazienti con AR.

I NETs costituiscono una forma di difesa da agenti patogeni dell'immunità innata: ammesso che gli istoni ivi contenuti possano costituire uno degli eventuali stimoli alla produzione di ACPA resta da capire perché solo i pazienti con AR producono tali anticorpi. I pazienti con AR potrebbero avere un'alterata clearance dei NETs (fatto peraltro già descritto in letteratura per altre patologie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico [Hakim et Al., 2010]), oppure la capacità di rispondere ad antigeni deiminati presentati in un contesto infiammatorio.

Abbiamo ipotizzato che gli ACPA potessero riconoscere gli istoni deiminati presenti nei NETs. Abbiamo quindi isolato i neutrofili e li abbiamo stimolati con sostanze come l'H₂O₂ che mimano uno stress ossidativo; abbiamo purificato i NETs e abbiamo separato le proteine mediante elettroforesi: questo ci ha permesso di evidenziare che alcune preparazioni di Ig derivate dai sieri di pazienti con AR sono effettivamente in grado di riconoscere una proteina di peso molecolare compatibile con l'H4 deiminato. Questa reattività non si osserva con le Ig purificate dagli NHS.

I nostri dati sono quindi molto suggestivi del fatto che gli istoni deiminati presenti nei NETs possono essere uno degli stimoli alla produzione degli ACPA.

Tra i nostri progetti per il futuro c'è quello di valutare se i NETs dei soggetti con AR sono qualitativamente e quantitativamente diversi da quelli prodotti da soggetti normali e se i granulociti dei pazienti con AR rispondono ai diversi stimoli in modo diverso rispetto ai normali.

CAPITOLO 4

Ruolo degli ACPA nell'artrite reumatoide

Il sistema monocito-macrofagico nell'AR

I monociti e i macrofagi sono essenziali per la difesa dell'ospite, sia perché eliminano direttamente gli agenti estranei, sia perché organizzano l'inizio e la risoluzione del processo infiammatorio [Mosser, 2003; Mantovani et Al., 2002]. I monociti acquisiscono proprietà specializzate in risposta alle citochine e ai prodotti degli agenti microbici, e vengono chiamati cellule M1 e M2. I macrofagi M1 sono quelli che vengono attivati classicamente e possono essere indotti dall'IFN- γ da solo o di concerto con stimoli microbici (per esempio LPS) o con altre citochine (per esempio TNF α e GM-CSF). L'IL-4 e l'IL-13, invece, inducono un altro tipo di macrofagi attivati, gli M2. I macrofagi M2 possono inoltre essere indotti dagli immunocomplessi (IC), dall'IL-10, dai glucocorticoidi e dalla vitamina D3. La fase iniziale della risposta infiammatoria, quindi, è sostenuta dai macrofagi attivati classicamente (M1) che hanno lo scopo di eliminare i microorganismi invasori e le cellule tumorali e promuovere una risposta immunitaria di tipo I (infiammatoria). La fase di risoluzione è invece sostenuta dai macrofagi attivati per via alternativa (M2): questi macrofagi rispondono poco a stimoli infiammatori e sono coinvolti nell'eliminazione di detriti, nell'angiogenesi, nel rimodellamento tissutale, nel risanare le ferite e nel promuovere la risposta immunitaria di tipo II.

I monociti/macrofagi giocano un ruolo importante nelle malattie autoimmuni sistemiche come il LES e l'AR, essendo entrambi coinvolti nell'organizzazione di una risposta autoimmune e nella mediazione di processi infiammatori che portano a un danno d'organo.

Il sistema monocita-macrofagico gioca un ruolo chiave nell'AR. I macrofagi, attivati localmente nella sinovia, sono coinvolti fin dal principio del processo infiammatorio e contribuiscono al perpetuarsi dello stesso: le citochine prodotte dai macrofagi, infatti, reclutano e attivano le cellule infiammatorie, determinano la degradazione della matrice e l'angiogenesi.

I monociti circolanti, nei pazienti con AR in fase attiva, rilasciano spontaneamente alte quantità di citochine proinfiammatorie [Hahn et Al., 1993; Burmester et Al., 1997] ed esprimono i geni che codificano per le citochine, per le proteine di fase acuta e gli enzimi che contribuiscono al processo infiammatorio [Stuhlmüller et Al., 2000]. I monociti dei pazienti con AR esprimono inoltre un'alta quantità di recettori Fc γ e ci sono diversi dati che suggeriscono un loro ruolo patogenetico.

Nei modelli animali, la delezione della catena γ ad azione attivatoria dei recettori, che causa una perdita funzionale di recettori Fc, protegge i topi dall'artrite indotta da collagene. Al contrario la delezione dell'unica catena inibitoria dell'Fc γ RII aggrava l'artrite indotta da collagene.

I recettori Fc γ interagiscono con le IgG con diversa affinità e con diversa specificità per le diverse sottoclassi di Ig [Nimmerjahn e Ravetch, 2006]: per questo, i livelli

di espressione dei recettori attivatori o inibitori e la qualità degli immunocomplessi (rapporto antigene/anticorpo, sottoclasse di anticorpo) influenzano il tipo di segnale che sarà trasmesso alla cellula.

In una risposta immune “normale” gli immunocomplessi attivano i macrofagi M2 contribuendo così alla risoluzione del processo infiammatorio; gli immunocomplessi generati durante una malattia autoimmune potrebbero invece contribuire a mantenere un ambiente infiammatorio.

In questa fase del nostro studio abbiamo cercato di accertare se gli immunocomplessi formati anticorpi anti-peptidi citrullinati complessati con l’antigene sono in grado di:

- Attivare in modo preferenziale i monociti M1 (pro-infiammatori)
- Guidare la maturazione dei monociti circolanti verso il fenotipo M1.

Materiali e metodi

Isolamento dei monociti/macrofagi. A ogni paziente/donatore sano abbiamo prelevato 20 ml di sangue venoso in siringa eparinata e li abbiamo diluiti 1:2 con D-PBS. Le cellule linfomonocitarie sono state isolate mediante centrifugazione differenziata su gradiente di Hystopaque (SIGMA). L’anello ottenuto è stato recuperato e lavato. Abbiamo quindi isolato i monociti dalle cellule mononucleate del sangue periferico per mezzo di una selezione immunomagnetica usando biglie magnetiche marcate con anticorpi anti-CD14: otteniamo così monociti con una purezza maggiore del 97%.

Per ottenere macrofagi, i monociti vengono messi in coltura per 7 giorni con aggiunta al mezzo di GM-CSF.

Antigeni e anticorpi. Le immunoglobuline da soggetti normali sono state isolate su colonne di proteina G; gli ACPA sono stati isolati dal siero di soggetti con AR come descritto nel Cap.2. Il peptide usato per l’isolamento è una sequenza citrullinata derivata dall’EBNA 1 (VCP).

Stimolazione dei monociti. I monociti vengono messi in coltura appena isolati in presenza di diversi stimoli: con immunocomplessi (sia in fase liquida che legati alla fase solida di una piastra per colture cellulari), anticorpi anti-VCP da soli e antigene (VCP) da solo. Quindi abbiamo raccolto i surnatanti delle colture cellulari a tempi diversi (6, 12, 24, 48 ore), e li abbiamo analizzati per la presenza di citochine.

Elisa sandwich per la ricerca delle citochine. L’ELISA sandwich è una tecnica utilizzata per individuare uno specifico antigene mediante due anticorpi, un anticorpo di cattura (Capture antibody) e uno di rivelazione (Detection antibody), entrambi specifici per l’antigene da ricercare. Le citochine che abbiamo preso in esame sono: l’IL-1 β , l’IL-1RA, il TNF α , l’IL-10 e l’IL-12. Per ogni citochina studiata abbiamo seguito la procedura suggerita dalla ditta produttrice. La concentrazione di ciascuna citochina nel campione in esame si ottiene confrontando la densità ottica del campione con quella di una curva di calibrazione ottenuta per diluizioni scalari di uno standard a concentrazione nota di citochina.

Risultati

Per stabilire le migliori condizioni di stimolo dei monociti da parte degli immunocomplessi abbiamo eseguito alcuni esperimenti preliminari incubando i monociti isolati da donatori sani con gli immunocomplessi sia in fase liquida che in fase solida e poi raccolto i surnatanti a 24 e 48 ore e abbiamo dosato l'IL-1 β , l'IL-1RA, il TNF α , l'IL-10 e l'IL-12. Da questi tests abbiamo dedotto che gli immunocomplessi adesi alla fase solida inducono la produzione di una maggior quantità di citochine. In un secondo gruppo di esperimenti abbiamo quindi utilizzato gli immunocomplessi adesi alla fase solida e, per meglio studiare la cinetica di produzione delle citochine, abbiamo raccolto i surnatanti a 6, a 12 e a 24 ore. Gli immunocomplessi sono stati incubati sia con monociti isolati da donatori sani che con macrofagi ottenuti dai suddetti monociti in seguito allo stimolo con GM-CSF. Abbiamo quindi dosato l'IL-1 β , l'IL-1RA, il TNF α , l'IL-10 e l'IL-12. Abbiamo potuto così stabilire che raccogliendo i surnatanti di coltura a 24 ore avevamo i risultati più interessanti.

Abbiamo quindi isolato i monociti da 5 donatori sani e da 13 pazienti con AR e li abbiamo incubati con gli immunocomplessi (anticorpi anti-VCP e VCP) adesi alla fase solida, con gli anticorpi da soli e con l'antigene da solo. Abbiamo quindi dosato l'IL-1 β , l'IL-1RA, il TNF α , l'IL-10 e l'IL-12 nei surnatanti raccolti a 24 ore. Abbiamo ottenuto i seguenti risultati:

- L'IL-10 non era dosabile;
- Per l'IL-12 non esiste uno stimolo che induce in modo particolare la produzione della citochina;
- Per l'IL-1RA, i monociti di 5/13 pazienti e di 3/5 donatori sani non vengono stimolati nella produzione della citochina; i monociti di 4/13 pazienti e 1/5 normali aumentano la produzione di IL-1RA dopo lo stimolo con IC; i monociti di 1/13 pazienti vengono stimolati in misura maggiore da una preparazione di Ig normali; i monociti di 1/13 pazienti vengono stimolati in misura maggiore dal solo VCP; i monociti di 2/13 pazienti e di 1/5 donatori sani sono attivati con qualsiasi stimolo;
- Per l'IL-1 β , i monociti estratti da 8/13 pazienti e da 4/5 donatori sani aumentano la produzione di IL-1 β quando incubati con gli IC, i monociti estratti da 3/13 pazienti e da 1/5 donatori sani non vengono attivati qualunque sia lo stimolo, i monociti di 1/13 pazienti sono stimolati dopo incubazione con una preparazione di Ig normali;
- Per il TNF α , i monociti estratti da 9/13 pazienti e da 3/5 donatori sani aumentano la produzione di TNF α quando incubati con gli IC, i monociti estratti da 4/13 pazienti e da 1/5 donatori sani non vengono attivati qualunque sia lo stimolo e i monociti di 1/5 donatori sani sono attivati sia dagli IC che da una preparazione di Ig normali.

Dal punto di vista quantitativo:

- i monociti dei pazienti producono, in media, una maggior quantità di TNF α rispetto ai monociti dei donatori sani (già in assenza di stimolo la produzione di

TNF α è leggermente maggiore -1,35 volte- nei monociti dei pazienti) quando stimolati con due preparazioni di Ig normali a concentrazione più elevata (rispettivamente 1,46 e 1,99 volte di più) e, con una delle due preparazioni di Ig normali, anche a concentrazione più bassa (1,89 volte di più), quando stimolati con gli IC a concentrazione più bassa ottenuti con due diverse preparazioni di anticorpi anti-VCP (rispettivamente 3,2 e 2,49 volte di più) e, con una delle due preparazioni di IC, anche quando gli anticorpi anti-VCP sono a concentrazione maggiore (2,34 volte di più);

- i monociti dei donatori sani producono, in assenza di stimolo, una maggior quantità di IL-1 β rispetto ai monociti dei pazienti (1,60 volte di più) ma anche quando stimolati con le due preparazioni di Ig normali a concentrazione più elevata (rispettivamente 1,41 e 1,93 volte di più) e, con una delle due preparazioni di Ig normali, anche a concentrazione più bassa (1,49 volte di più), quando stimolati con gli IC ottenuti con due diverse preparazioni di anticorpi anti-VCP ad elevata concentrazione (rispettivamente 1,61 e 1,77 volte di più), quando stimolati con il VCP da solo (2,54 volte di più). Tuttavia la produzione di IL-1 β da parte dei monociti dei pazienti aumenta drasticamente, quando vengono incubati con l'altra preparazione di Ig normale a concentrazione più bassa (16,52 volte di più) e quando stimolati con gli IC ottenuti con le due diverse preparazioni di anticorpi anti-VCP a più bassa concentrazione (rispettivamente 28,16 e 23,63 volte di più) (fig. 16, fig. 17);
- i monociti dei donatori sani producono, in media, una maggior quantità di IL-12 rispetto ai monociti dei pazienti, quando stimolati con una delle due preparazioni di Ig normali a concentrazione più elevata (1,45 volte di più) e con la stessa preparazione a concentrazione minore (1,90 volte di più), quando stimolati con gli IC ottenuti con una delle due diverse preparazioni di anticorpi anti-VCP ad elevata concentrazione (1,71 volte di più) e con la stessa preparazione a concentrazione minore (1,40 volte di più) e quando stimolati con il VCP da solo (2,01 volte di più);
- non esistono differenze quantitative nella produzione di IL-1RA tra i monociti dei donatori sani e quelli dei pazienti.
- Il maggior incremento nella produzione di citochine dopo uno stimolo si ha per la produzione di IL-1 β e di TNF α dopo l'incubazione dei monociti dei pazienti AR con con una delle due preparazioni di Ig normali a concentrazione più bassa o con gli IC ottenuti con le due diverse preparazioni di anticorpi anti-VCP a più bassa concentrazione

I monociti di 5/13 pazienti e di 2/5 donatori sani sono stati incubati con GM-CSF al fine di ottenere macrofagi. I macrofagi così ottenuti sono stati incubati con IC (anticorpi anti-VCP e VCP) adesi alla fase solida, con gli anticorpi da soli e con l'antigene da solo; dopo 24 ore abbiamo raccolto i surnatanti e dosato le citochine:

- Per l'IL-1RA nessun tipo di stimolo sembra indurre un aumento nella produzione della citochina in quanto già senza stimoli, la produzione di IL-1RA era elevata;
- Per il TNF α la sua produzione viene stimolata in modo elettivo da una

preparazione di Ig normali per i macrofagi ottenuti dai pazienti, i macrofagi ottenuti da 1/2 donatori sani hanno la tendenza a produrre una maggior quantità di TNF α quando incubati con immunocomplessi patologici;

- Per l'IL-1 β i macrofagi di 2/5 pazienti non aumentano la produzione della citochina qualunque sia lo stimolo applicato, i macrofagi di 3/5 pazienti producono più IL-1 β dopo stimolo con una preparazione di Ig normali, i macrofagi di 1/2 donatori sani vengono stimolati a produrre la citochina dopo lo stimolo con immunocomplessi patologici e con una preparazione di Ig normali, per l'altro donatore nessuno stimolo contribuisce ad aumentare la produzione di IL-1 β .

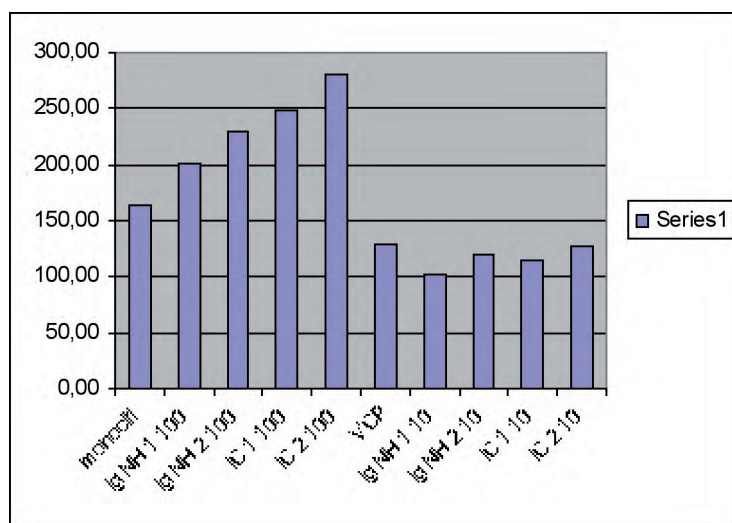


Fig. 16 Effetti degli IC sulla produzione di TNF da parte dei monociti estratti da pazienti AR

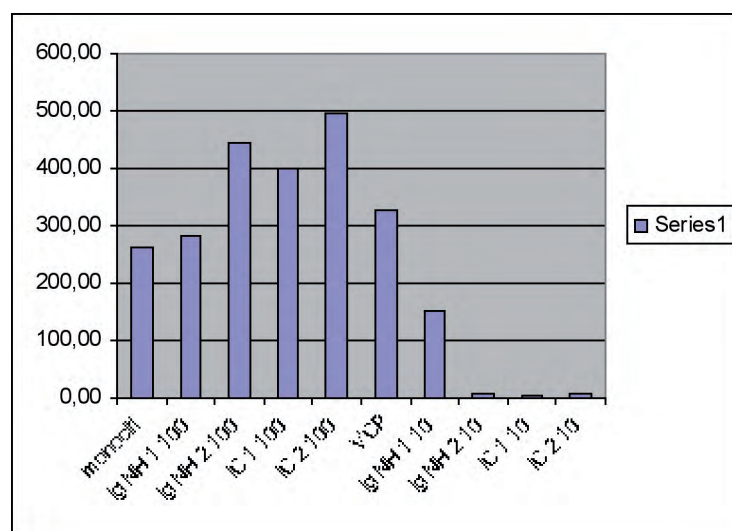


Fig. 17 Effetti degli IC sulla produzione di TNF da parte dei monociti estratti da donatori sani

Discussione

Uno dei possibili meccanismi di danno da autoanticorpi è rappresentato dalla formazione di immunocomplessi che interagendo con monocito/macrofagi li attivano ed inducono la produzione di citochine pro-infiammatorie.

Negli esperimenti descritti in questo capitolo abbiamo valutato la capacità pro-infiammatoria di immunocomplessi formati da un antigene citrullinato complessato con anticorpi specifici. Si tratta quindi di un approccio del tutto innovativo rispetto a quello tradizionale di utilizzare immunoglobuline complessate al calore come modello di immunocomplesso.

La valutazione complessiva dei risultati ottenuti in questi esperimenti è difficile perché abbiamo scelto di esaminare la risposta di cellule ottenute da molti controlli e molti pazienti e i dati indicano con estrema chiarezza una grossa variabilità individuale nella produzione di citochine in risposta a ogni stimolo. Questo probabilmente riflette una variabilità nell'attivazione basale del sistema monocito/macrofagico di ogni individuo (per esempio per stimoli infettivi clinicamente non evidenti) che rende più complessa l'analisi dei risultati.

Anche alcune delle preparazioni di immunoglobuline normali usate negli esperimenti possono attivare i monociti: è possibile che contengano aggregati di Ig che si comportano come "veri" immunocomplessi. Comunque, l'ultracentrifugazione non abolisce questa reattività, suggerendo che le immunoglobuline anche in forma monometrica possano legarsi ai recettori per Fc o che, in alternativa, gli aggregati siano molto piccoli.

Dai nostri studi possiamo dedurre che:

- Gli immunocomplessi patologici stimolano la produzione di IL-1RA nei monociti di 4/13 pazienti e di 1/5 donatori sani, la produzione di IL-1 β nei monociti di 8/13 pazienti e di 4/5 donatori sani e la produzione di TNF α in 9/13 pazienti e di 3/5 donatori sani. La capacità di indurre la produzione di IL-1 β in particolare è indotta in maggior misura dagli immunocomplessi nei monociti di pazienti. Gli stimoli infiammatori inducono allo stesso tempo la produzione della citochina pro-infiammatoria e del suo antagonista naturale, IL-1RA, attivando quindi anche un meccanismo di controllo e regolazione.
- Sembra che i monociti di soggetti sani o di pazienti con AR rispondano in modo "qualitativamente" simile agli immunocomplessi, producendo cioè lo stesso tipo di citochine.

Un'analisi quantitativa dei nostri risultati mostra che:

- i monociti di soggetti sani o di pazienti AR producono sì le stesse citochine, ma in quantità diverse: per esempio il TNF α è prodotto, in media, in quantità maggiori dai monociti di pazienti AR. Questo non vale per l'IL-1RA che, in media, viene prodotta in quantità molto simile dai monociti dei pazienti e dai monociti dei donatori sani: ciò può indicare che questo meccanismo di controllo e regolazione dell'infiammazione non è alterato nell'AR;
- gli stimoli più efficaci per la produzione di TNF α e di IL-1 β , almeno per i monociti di pazienti AR sembrano essere gli IC ottenuti con gli anticorpi anti-

VCP a concentrazione minore (fig. 1, fig. 2): questo suggerisce che non è solo la presenza o meno dell'IC ad attivare un monocita ma che è importante anche la tipologia di IC (per esempio se si forma in eccesso di antigene);

- tranne per l'IL-1RA la produzione delle altre citochine studiate non è già elevata nei monociti in assenza di stimolo e soprattutto non ci sono differenze importanti tra i monociti dei pazienti AR e quelli dei donatori sani: questo può suggerirci che probabilmente non esista una predisposizione malattia dipendente dei monociti a produrre più citochine proinfiammatorie, ma che sia effettivamente necessario uno stimolo che attiva il monocita in senso proinfiammatorio.

Tutto questo ci fa ipotizzare che nella patogenesi della malattia il fattore più importante sia la presenza in circolo o a livello sinoviale di immunocomplessi piuttosto che la reattività dei monociti.

CAPITOLO 5

Conclusioni generali

I sieri dei pazienti con AR riconoscono diverse proteine citrullinate (filaggrina, collagene II, enolasi, fibrinogeno, vimentina): gli anticorpi specifici per l'AR, che riconoscono tali proteine citrullinate, rappresentano una famiglia di anticorpi con specificità in parte sovrapponibili che possono essere collettivamente chiamati anticorpi anti-proteine/peptidi citrullinati (ACPA).

Queste proteine, riconosciute dai sieri dei pazienti con AR, hanno in comune, nella loro sequenza aminoacidica, delle arginine fiancheggiate da aminoacidi piccoli e neutri come la glicina, la serina o la treonina. Gli istoni sono proteine ricche di arginine, che, in certe parti della loro sequenza, sono fiancheggiate appunto da tali aminoacidi: dal punto di vista biochimico, hanno quindi le caratteristiche tipiche per essere riconosciute dagli ACPA. In questo lavoro abbiamo esaminato con maggior dettaglio le caratteristiche degli anticorpi specifici per peptidi derivati dagli istoni.

I risultati ottenuti indicano che soltanto i sieri di AR reagiscono con i peptidi citrullinati derivati dagli istoni; al contrario è di interesse che i sieri di LES, che contengono anticorpi anti-istoni, non reagiscano con le sequenze in cui l'arginina è sostituita da citrullina.

La reattività con questi peptidi si associa alla presenza di fattore reumatoide; inoltre, i titoli anticorpali sono correlati a quelli ottenuti con altri metodi per misurare ACPA. Tutti questi dati indicano che i peptidi citrullinati derivati dagli istoni misurano anticorpi appartenenti alla famiglia degli ACPA.

HCP1 e HCP2 possono quindi essere utilizzati in un test diagnostico di elevata specificità e buona sensibilità. La sovrapposizione solo parziale tra i risultati ottenuti con peptidi diversi fa sì che l'uso combinato di questi test incrementi notevolmente la possibilità di fare diagnosi (sierologica) di AR.

E' quindi ipotizzabile in futuro lo sviluppo di metodi analitici di tipo multiplex, in cui siano utilizzati insieme tutti questi peptidi, per ottenere la massima sensibilità diagnostica.

L'analisi della specificità degli anticorpi anti-peptidi citrullinati istonici, condotta su anticorpi purificati per cromatografia di affinità sul peptide, ha evidenziato come gli anticorpi abbiano un'elevata affinità per il peptide omologo, ma siano crossreattivi con altre sequenze citrullinate, anche derivate da proteine diverse. Risultati analoghi sono stati ottenuti da altri autori studiando altre proteine citrullinate come il fibrinogeno o la filaggrina, o anticorpi purificati dai peptidi adesi alla fase solida nel test CCP.

L'elevata frequenza con cui sieri di soggetti con AR reagiscono con peptidi derivati dagli istoni solleva interrogativi sul potenziale ruolo di queste proteine endogene nell'indurre la produzione di ACPA.

E' stato dimostrato che la PAD4 è responsabile della iper-citrullinazione delle proteine istoniche, che si verifica nell'apoptosi e nella formazione delle NETs, le "neutrophil extracellular traps", costituite da cromatina nucleare ed istoni.

In risposta agli stessi stimoli che inducono la deiminazione istonica infatti, si assiste nei granulociti ad un processo di disintegrazione nucleare tramite il quale si arriva ad una massiva redistribuzione della cromatina all'esterno della cellula, che va, insieme alle proteine istoniche deimate, anch'esse fuoriuscite nello spazio extracellulare in seguito alla degranulazione dei neutrofilo, a determinare la costituzione dei NETs, il cui ruolo è quello di arginare la diffusione delle infezioni attraverso diversi meccanismi a tutt'oggi non completamente chiariti.

Se da un lato la deiminazione e la fuoriuscita dalle cellule delle proteine istoniche può avere un effetto benefico nella risposta ad agenti infettivi, dall'altro può invece determinare lo stimolo per l'instaurarsi di una reazione autoimmune, proprio perché promuoverebbe l'incontro delle cellule del sistema immune con "nuovi" antigeni endogeni.

In soggetti con background genetico "adatto", il contatto tra peptidi self citrullinati e cellule del sistema immune innato ed adattativo, verificatosi in presenza degli adeguati stimoli infiammatori, potrebbe portare alla produzione di ACPA.

Sebbene la presenza degli ACPA sia una caratteristica tipica dell'artrite reumatoide, il loro contributo alla patogenesi della malattia è ancora poco chiaro.

In questo lavoro di tesi abbiamo valutato il ruolo degli immunocomplessi formati dagli ACPA nell'attivazione dei monociti. I risultati ottenuti suggeriscono che gli immunocomplessi possano stimolare nei monociti, soprattutto in quelli provenienti da pazienti con artrite reumatoide, la produzione di citochine pro-infiammatorie. Grazie ai meccanismi fini di regolazione di questi processi, l'innescamento del meccanismo dell'infiammazione comporta anche la contemporanea attivazione dei circuiti che portano al suo spegnimento. Infatti, insieme alla produzione di IL-1 e TNF α , gli ACPA complessati con l'antigene inducono la produzione della citochina anti-infiammatoria IL-1RA. Questo circuito di controllo è funzionante anche nei soggetti con AR: i monociti dei pazienti sono in grado di produrre questa citochina come i soggetti normali. L'alterazione di questi meccanismi di controllo è infatti tipica delle malattie autoinfiammatorie ma non delle malattie autoimmuni.

Nella sinovia dei soggetti con AR sono presenti in gran quantità proteine deimate, fra cui è particolarmente abbondante la fibrina. Non è stata ancora dimostrata la presenza di NET nella sinovia, ma i granulociti costituiscono una parte importante dell'infiltrato infiammatorio sinoviale e le condizioni locali (ambiente citochinico, stress ossidativo) sono in grado di indurre questa risposta nei granulociti. Anche gli istoni deimati potrebbero essere quindi presenti nel tessuto sinoviale. E' stata anche dimostrata la produzione locale, da parte delle plasmacellule infiltranti la sinovia, di ACPA che sono molto concentrati nel liquido sinoviale. Gli ACPA possono quindi incontrare localmente l'antigene e formare immunocomplessi nel tessuto sinoviale. La presenza di fattore reumatoide (anch'esso prodotto localmente) può fare aumentare le dimensioni dei complessi e l'interazione con i monociti può determinarne l'attivazione. Gli ACPA possono quindi contribuire direttamente all'innescamento di quei meccanismi infiammatori che conducono al danno articolare.

Bibliografia

- A.A.V.V. Harrison-Principi di medicina interna. 14° ed. McGrawHill Libri Italia Milano 1999.
- A.A.V.V. Kelley's Textbook of Rheumatology. 6° ed. W.B. Saunders Company Philadelphia 2001.
- Aho K, von Essen R, Kurki P, Palosuo T, Heliövaara M. Antikeratin antibody and antiperinuclear factor as markers for subclinical rheumatoid disease process. *J Rheumatol*. 1993 Aug;20(8):1278-81.
- Akiyama K, Sakurai Y, Asou H, Senshu T. Localization of peptidylarginine deiminase type II in a stage-specific immature oligodendrocyte from rat cerebral hemisphere. *Neurosci Lett*. 1999 Oct 15;274(1):53-5.
- Anzilotti C, Merlini G, Pratesi F, Tommasi C, Chimenti D, Migliorini P. Antibodies to viral citrullinated peptide in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2006; 33:647-51.
- Anzilotti C, Pratesi F, Tommasi C, Migliorini P. Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease. *Autoimmun Rev*. 2010; 9:158-160.
- Arita K, Hashimoto H, Shimizu T, Nakashima K, Yamada M, Sato M. Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 Aug;11(8):777-83.
- Asaga H, Nakashima K, Senshu T, Ishigami A, Yamada M. Immunocytochemical localization of peptidylarginine deiminase in human eosinophils and neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2001 Jul;70(1):46-51.
- Asaga H, Yamada M, Senshu T. Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1998; 243: 641–646.
- Atherton E and Sheppard RC. *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press 1989.
- Augusto LA, Decottignies P, Synguelakis M, Nicaise M, Le Marechal P, Chaby R. Histones: a novel class of lipopolysaccharide-binding molecules. *Biochemistry*. 2003 Apr 8;42(13):3929-38.
- Balsa A, Cabezón A, Orozco G, Cobo T, Miranda-Carus E, López-Nevot MA, Vicario JL, Martín-Mola E, Martín J, Pascual-Salcedo D. Influence of HLA DRB1 alleles in the susceptibility of rheumatoid arthritis and the regulation of antibodies against citrullinated proteins and rheumatoid factor. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(2):R62.
- Barton A, Bowes J, Eyre S, Spreckley K, Hinks A, John S, Worthington J. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population. *Arthritis Rheum*. 2004 Apr;50(4):1117-21.
- Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, and Henriques-Normark B. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol*. 2006 16 : 401 – 407.
- Blass S, Specker C, Lakomek HJ, Schneider EM, Schwochau M. Novel 68 kDa autoantigen detected by rheumatoid arthritis specific antibodies. *Ann Rheum Dis*. 1995 May;54(5):355-60.
- Blass S, Union A, Raymackers J, Schumann F, Ungethum U, Muller-Steinbach S, De Keyser F, Engel JM, Burmester GR. The stress protein BiP is overexpressed and is a major B and T cell target in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2001 Apr;44(4):761-71.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.
- Brix K, Summa W, Lottspeich F, Herzog V. Extracellularly occurring histone H1 mediates the binding of thyroglobulin to the cell surface of mouse macrophages. *J Clin Invest*. 1998 Jul 15;102(2):283-93.
- Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, Kristian SA, Kotb M, Feramisco J, and Nizet V. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr. Biol*. 2006 16: 396 – 400.
- Burkhardt H, Sehnert B, Bockermann R, Engstrom A, Kalden JR, Holmdahl R. Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2005;35:1643–1652.
- Burmester GR, Stuhlmüller B, Keyszer G, Kinne RW. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? *Arthritis Rheum*. 1997;40(1):5-18.
- Cantaert T., De Rycke L., Bongartz T. et al. (2006) Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheum* 54:3381-3389
- Caponi L, Petit-Teixeira E, Sebbag M, Bongiorno F, Moscato S, Pratesi F, Pierlot C, Osorio J, Chapuy-Regaud S, Guerrin M, Cornelis F, Serre G, Migliorini P; ECRAF. A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population. *Ann Rheum Dis*. 2005 Apr;64(4):587-93.
- Carson DA, Chen PP, Fox RI, Kipps TJ, Jirik F, Goldfien RD, Silverman G, Radoux V, Fong S. Rheumatoid factor and immune networks. *Annu Rev Immunol*. 1987;5:109-26.
- Chang X, Yamada M, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhiko S, Yamamoto K. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005 Jan;44(1):40-50.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *The pathologic basis of disease*, 5th edition. 1997;
- Cugini P, Fiorelli G, Guarin G, Lopez M, Violi F, Volpe M: *Teodori-Trattato italiano di medicina interna*. 7° ed. Società

Editrice Universo Roma 2004.

- Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*. 2004 Sep 3;118(5):545-53.
- Despres N, Boire G, Lopez-Longo FJ, Menard HA. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1994 Jun;21(6):1027-33.
- Dieude P, Cornelis F. Genetic basis of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2005 Dec;72(6):520-6.
- Dimitrov SI, Wolffe AP. Fine resolution of histones by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: developmental implications. *Methods*. 1997 May;12(1):57-61.
- Dorner T. (2006) Crossroads of B cell activation in autoimmunity: rationale of targeting B cells. *J.Rheumatol.Suppl* 77:3-11
- Dorner T., Egerer K., Feist E., and Burmester G.R. (2004) Rheumatoid factor revisited. *Curr.Opin.Rheumatol*. 16:246-253.
- Du Clos TW, Zlock LT, Marnell L. Definition of a C-reactive protein binding determinant on histones. *J Biol Chem*. 1991 Feb 5;266(4):2167-71.
- Ehrenstein M.R., Evans J.G., Singh A., Moore S., Warnes G. Isenberg D.A., and Mauri C. (2004) Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J.Exp.Med*. 200:277-285
- Forslin K, Vincent C, Serre G, Svensson B. Antifilaggrin antibodies in early rheumatoid arthritis may predict radiological progression. *Scand J Rheumatol*. 2001;30(4):221-4.
- Fuchs T.A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol*. 176: 231 – 241.
- Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, Simon M, Senshu T, Masson-Bessiere C, Jolivet-Reynaud C, Jolivet M, Serre G. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues. *J Immunol*. 1999 Jan 1;162(1):585-94.
- Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1987 Nov;30(11):1205-13.
- Guerrin M, Ishigami A, Mechin MC, Nachat R, Valmary S, Sebbag M, Simon M, Senshu T, Serre G. cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I. *Biochem J*. 2003 Feb 15;370(Pt 1):167-74.
- Hagiwara T, Nakashima K, Hirano H, Senshu T, Yamada M. Deimination of arginine residues in nucleophosmin/B23 and histones in HL-60 granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Jan 25;290(3):979-83.
- Hahn G, Stuhlmüller B, Hain N, Kalden JR, Pfilzenmaier K, Burmester GR. Modulation of monocyte activation in patients with rheumatoid arthritis by leukapheresis therapy. *J Clin Invest*. 1993;91(3):862-70.
- Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. 2010 May 25;107(21):9813-8.
- Hariton-Gazal E, Rosenbluh J, Graessmann A, Gilon C, Loyter A. Direct translocation of histone molecules across cell membranes. *J Cell Sci*. 2003 Nov 15;116(Pt 22):4577-86.
- He B., Qiao X., and Cerutti A. (2004) CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J.Immunol*. 173:4479-4491.
- Herren T, Burke TA, Das R, Plow EF. Identification of histone H2B as a regulated plasminogen receptor. *Biochemistry*. 2006 Aug 8;45(31):9463-74.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:425-79.
- Hoet RM & Van Venrooij WJ. The antiperinuclear factor (APF) and antikeratin antibodies (AKA) in rheumatoid arthritis. In: *Rheumatoid arthritis*. Smolen JS, Kalden JR Maini RN, editors, Berlin, Germany: Springer-Verlag 1992.
- Hoet RM, Boerbooms AM, Arends M, Ruiten DJ, van Venrooij WJ. Antiperinuclear factor, a marker autoantibody for rheumatoid arthritis: colocalisation of the perinuclear factor and profilaggrin. *Ann Rheum Dis*. 1991 Sep;50(9):611-8. (a)
- Ikari K, Kuwahara M, Nakamura T, Momohara S, Hara M, Yamanaka H, Tomatsu T, Kamatani N. Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a replication study. *Arthritis Rheum*. 2005 Oct;52(10):3054-7.
- Inagaki, M., Takahara, H., Nishi, Y., Sugawara, K., & Sato, C. (1989). Ca²⁺-dependent deimination-induced disassembly of intermediate filaments involves specific modification of the amino-terminal head domain. *J. Biol. Chem.*, 264: 18119–18127.
- Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Manabe M, O'Guin WM, Dale BA, Iizuka H. Distinctive expression of filaggrin and trichohyalin during various pathways of epithelial differentiation. *Br J Dermatol*. 1997 Jul;137(1):9-16.
- Kanno T, Kawada A, Yamanouchi J, Yosida-Noro C, Yoshiki A, Shiraiwa M, Kusakabe M, Manabe M, Tezuka T, Takahara H. Human peptidylarginine deiminase type III: molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA, properties of the recombinant enzyme, and immunohistochemical localization in human skin. *J Invest Dermatol*. 2000 Nov;115(5):813-23.
- Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne HJ, Brinkmann V, Jenne DE. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009 Jun;15(6):623-5.

- Kim HS, Yoon H, Minn I, Park CB, Lee WT, Zasloff M, Kim SC. Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I. *J Immunol.* 2000 Sep 15;165(6):3268-74.
- Kimura H, Cook PR. Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J Cell Biol.* 2001 Jun 25;153(7):1341-53.
- Kimura H. Histone dynamics in living cells revealed by photobleaching. *DNA Repair (Amst).* 2005 Jul 28;4(8):939-50.
- Kinloch A, et al. Identification of citrullinated α -enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1421–R1429.
- Konishi A, Shimizu S, Hirota J, Takao T, Fan Y, Matsuoka Y, Zhang L, Yoneda Y, Fujii Y, Skoultchi AI, Tsujimoto Y. Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell.* 2003 Sep 19;114(6):673-88.
- Kurki P, Aho K, Palosuo T, Heliovaara M. Immunopathology of rheumatoid arthritis. Antikeratin antibodies precede the clinical disease. *Arthritis Rheum.* 1992 Aug;35(8):914-7.
- Kuwahara M, Ikari K, Nakamura T, Momohara S, Saito S, Hara M, et al. Independent confirmation of the association between PADI4 and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50(suppl.9):S353
- Lau C.M., Broughton C., Tabor A.S., Akira S., Flavell R.A., Mamula M.J., Christensen S.R., Shlomchik M.J., Viglianti G.A., Rifkin I.R. et al. (2005) RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J.Exp.Med.* 202:1171-1177
- Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature.* 2002;416(6881):603-7.
- Makrigiannakis D., Hermansson M., Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJW, Eklund A, Grunewald J, Skold CM, Klareskog L, Catrina AI. Smoking increases PAD2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:1488-92
- Mallya RK, Young BJ, Pepys MB, Hamblin TJ, Mace BE, Hamilton EB. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis: frequency and correlation with other features of the disease. *Clin Exp Immunol.* 1983 Jan;51(1):17-20.
- Manabe M, Sanchez M, Sun TT, Dale BA. Interaction of filaggrin with keratin filaments during advanced stages of normal human epidermal differentiation and in ichthyosis vulgaris. *Differentiation.* 1991 Sep;48(1):43-50.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23: 549.
- Masson-Bessiere C, Sebbag M, Durieux JJ, Nogueira L, Vincent C, Girbal-Neuhauser E, Durroux R, Cantagrel A, Serre G. In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum. *Clin Exp Immunol.* 2000 Mar;119(3):544-52.
- Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol.* 2001 Mar 15;166(6):4177-84.
- Mauri C. and Ehrenstein M.R. (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. *B cells. Arthritis Res. Ther.* 9:205
- Merrifield RB. Solid phase synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. *J Ann Chem* 1963;85:2149-2153;
- Meyer O, Combe B, Elias A, Benali K, Clot J, Sany J, Eliaou JF. Autoantibodies predicting the outcome of rheumatoid arthritis: evaluation in two subsets of patients according to severity of radiographic damage. *Ann Rheum Dis.* 1997 Nov;56(11):682-5.
- Meyer O, Fabregas D, Cyna L, Ryckewaert A. [Anti-keratin antibodies. A marker of progressive rheumatoid arthritis] *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1986 Nov;53(11):601-5.
- Minota S, Morino N, Sakurai H, Yamada A, Yazaki Y. Interrelationship between autoepitope, DNA-binding domain, and CRP-binding domain on a histone H1 molecule. *Clin Immunol Immunopathol.* 1993 Mar;66(3):269-71.
- Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 2003;73: 209.
- Murphy C.A., Langrish C.L., Chen Y., Blumenschein W., McClanahan T., Kastelein R.A., Sedgwick J.D., and Cua D.J. (2003) Divergent proand antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J.Exp. Med.* 198:1951-1957
- Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M. Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J Biol Chem.* 2002 Dec 20;277(51):49562-8.
- Neeli I, Khan SN, Radic M. Histone Deimination As a Response to Inflammatory Stimuli in Neutrophils. *J Immunol.* 2008 Feb 1;180(3): 1895–1902.
- Nienhuis RL, Mandema E. A new serum factor in patients with Rheumatoid Arthritis; the antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis.* 1964 Jul;23:302-5.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcgamma receptors: old friends and new family members. *Immunity.* 2006;24(1):19-28.
- Nogueira L, Sebbag M, Vincent C, Arnaud M, Fournie B, Cantagrel A, Jolivet M, Serre G. Performance of two ELISAs for antifilaggrin autoantibodies, using either affinity purified or deiminated recombinant human filaggrin, in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2001 Sep;60(9):882-7.
- Nomura K. Specificity and mode of action of the muscle-type protein-arginine deiminase. *Arch Biochem Biophys.* 1992 Mar;293(2):362-9.
- Paimela L, Gripenberg M, Kurki P, Leirisalo-Repo M. Antikeratin antibodies: diagnostic and prognostic markers for early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1992 Jun;51(6):743-6

- Palosuo T, Lukka M, Alenius H, Kalkkinen N, Aho K, Kurki P, Heikkila R, Nykanen M, von Essen R. Purification of filaggrin from human epidermis and measurement of antifilaggrin autoantibodies in sera from patients with rheumatoid arthritis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Int Arch Allergy Immunol*. 1998 Apr;115(4):294-302.
- Park IY, Park CB, Kim MS, Kim SC. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Lett*. 1998 Oct 23;437(3):258-62.
- Parseghian MH, Luhrs KA. Beyond the walls of the nucleus: the role of histones in cellular signaling and innate immunity. *Biochem Cell Biol*. 2006 Aug;84(4):589-604.
- Pearton DJ, Dale BA, Presland RB. Functional analysis of the profilaggrin N-terminal peptide: identification of domains that regulate nuclear and cytoplasmic distribution. *J Invest Dermatol*. 2002 Sep;119(3):661-9.
- Piacentini M, Colizzi V. Tissue transglutaminase: apoptosis versus autoimmunity. *Immunol Today*. 1999 Mar;20(3):130-4.
- Pratesi F, Tommasi C, Anzilotti C, Chimenti D, Migliorini P. Deiminated Epstein Barr Virus Nuclear Antigen I is a target of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:733-41.
- Pratesi F, Tommasi C, Anzilotti C, Puxeddu I, Sardano E, Di Colo G, Migliorini P. Antibodies to a new viral citrullinated peptide, VCP2: fine specificity and correlation with anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) and anti-VCP1 antibodies. *Clin Exp Immunol*. 2011 Jun;164(3):337-45.
- Pruijin GJ, Wiik A, van Venrooij WJ. The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther*. 2010;12:203
- Quismorio FP Jr, Kaufman RL, Beardmore T, Mongan ES. Reactivity of serum antibodies to the keratin layer of rat esophagus in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1983 Apr;26(4):494-9.
- Raijmakers R, Zendman AJ, Egberts WV, Vossenaar ER, Raats J, Soede-Huijbregts C, Rutjes FP, van Veelen PA, Drijfhout JW, Pruijn GJ. Methylation of arginine residues interferes with citrullination by peptidylarginine deiminases in vitro. *J Mol Biol*. 2007 Apr 6;367(4):1118-29.
- Rathmell JC, Thompson CB. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:781-828.
- Reviron D, Perdriger A, Toussiro E, Wendling D, Balandraud N, Guis S, Semana G, Tiberghien P, Mercier P, Roudier J. Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2001 Mar;44(3):535-40.
- Maini RN, Zvaifler NJ. Rheumatoid arthritis. in "Rheumatology", J.H. Clipper, P.A. Dieppe Eds, Mobsy, London 1994;
- Rose FR, Bailey K, Keyte JW, Chan WC, Greenwood D, Mahida YR. Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract. *Infect Immun*. 1998 Jul;66(7):3255-63.
- Roudier J, Petersen J, Rhodes GH, Luka J, Carson DA. Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR beta-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jul;86(13):5104-8.
- Sambandam, T., Belousova, M., Accaviti-Loper, M. A., Blanquicett, C., Guercello, V., Raijmakers, R., et al. (2004). Increased peptidylarginine deiminase type II in hypoxic astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325(4), 1324–1329.
- Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. 1998 Jan 1;101(1):273-81.
- Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*. 2000 Jan;43(1):155-63.
- Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessiere C, Girbal E, Durieux JJ, Serre G. The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. 1995 Jun;95(6):2672-9.
- Sebbag M., Chapuy-Regaud S., Auger I., et al. Clinical and pathophysiological significance of the autoimmune response to citrullinated proteins in Rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2004;
- Senshu T, Akiyama K, Ishigami A, Nomura K. Studies on specificity of peptidylarginine deiminase reactions using an immunochemical probe that recognizes an enzymatically deiminated partial sequence of mouse keratin K1. *J Dermatol Sci*. 1999 Sep;21(2):113-26.
- Simon M, Girbal E, Sebbag M, Gomes-Daudrix V, Vincent C, Salama G, Serre G. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1993 Sep;92(3):1387-93.
- Smith TP, John DA, Bailey CJ. Epidermolytic toxin binds to components in the epidermis of a resistant species. *Eur J Cell Biol*. 1989 Aug;49(2):341-9.
- Stuhlmüller B, Ungethüm U, Scholze S, Martinez L, Backhaus M, Kraetsch HG, Kinne RW, Burmester GR. Identification of known and novel genes in activated monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000;43(4):775-90.
- Su A.I. , T. Wiltshire, S. Batalov, H. Lapp, K.A. Ching, D. Block, J. Zhang, R. Soden, M. Hayakawa, G. Kreiman,

- et al.. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 20;101(16):6062-7.
- Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiko S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2003 Aug;34(4):395-402.
 - Tam JP. Synthetic Peptide Vaccine Design: synthesis and properties of a high density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5409-5013;
 - Tarcsa, E., Marekov, L. N., Mei, G., Melino, G., Lee, S. C., & Steinert, P. M. (1996). Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J. Biol. Chem.*, 271(48), 30709–30716.
 - Ulvestad E, Kanestrom A, Madland TM, Thomassen E, Haga HJ. Clinical utility of diagnostic tests for rheumatoid factor. *Scand J Rheumatol*. 2001;30(2):87-91.
 - Union A, Meheus L, Humbel RL, Conrad K, Steiner G, Moereels H, Pottel H, Serre G, De Keyser F. Identification of citrullinated rheumatoid arthritis-specific epitopes in natural filaggrin relevant for antifilaggrin autoantibody detection by line immunoassay. *Arthritis Rheum*. 2002 May;46(5):1185-95.
 - Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009 Oct;5(10):e1000639.
 - van Amelsfort J.M., Jacobs K.M., Bijlsma J.W., Lafeber F.P., and Taams L.S. (2004) CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum*. 50:2775-2785
 - van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, Toes RE, Huizinga TW. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum*. 2004 Mar;50(3):709-15.
 - van Stipdonk MJ, Willems AA, Amor S, Persoon-Deen C, Travers PJ, Boog CJ, van Noort JM. T cells discriminate between differentially phosphorylated forms of alphaB-crystallin, a major central nervous system myelin antigen. *Int Immunol*. 1998 Jul;10(7):943-50.
 - van Venrooij WJ, Vossenaar ER, Zendman AJ. Anti-CCP antibodies: the new rheumatoid factor in the serology of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2004 Jun;3 Suppl 1:S17-9.
 - Vincent C, de Keyser F, Masson-Bessiere C, Sebbag M, Veys EM, Serre G. Anti-perinuclear factor compared with the so called “antikeratin” antibodies and antibodies to human epidermis filaggrin, in the diagnosis of arthritides. *Ann Rheum Dis*. 1999 Jan;58(1):42-8.
 - Vincent C, Nogueira L, Clavel C, Sebbag M, Serre G. Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity*. 2005 Feb;38(1):17-24.
 - Vincent C, Serre G, Lapeyre F, Fournie B, Ayrolles C, Fournie A, Soleilhavoup JP. High diagnostic value in rheumatoid arthritis of antibodies to the stratum corneum of rat oesophagus epithelium, so-called ‘antikeratin antibodies’. *Ann Rheum Dis*. 1989 Sep;48(9):712-22.
 - Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, van Venrooij WJ, Menard HA. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(2):R142-50. (a)
 - Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A, van Mansum MA, Dieteren C, de Rooij DJ, Barrera P, Zendman AJ, van Venrooij WJ. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis*. 2004 Apr;63(4):373-81. (b)
 - Vossenaar ER, van Venrooij WJ. Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(3):107-11.
 - Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays*. 2003 Nov;25(11):1106-18.
 - Walther J., Van Venrooij WJ., van Beers JJBC., Pruijn Ger JM. (2008) Anti-CCP antibody, a marker for the early detection of rheumatoid arthritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1143:268-285.
 - Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 2009 Jan 26;184(2):205-13
 - Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, Roeder RG, Clarke S, Stallcup MR, Allis CD, Coonrod SA. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination. *Science*. 2004 Oct 8;306(5694):279-83.
 - Watanabe K, Senshu T. Isolation and characterization of cDNA clones encoding rat skeletal muscle peptidylarginine deiminase. *J Biol Chem*. 1989 Sep 15;264(26):15255-60.
 - Wu D, Ingram A, Lahti JH, Mazza B, Grenet J, Kapoor A, Liu L, Kidd VJ, Tang D. Apoptotic release of histones from nucleosomes. *J Biol Chem*. 2002 Apr 5;277(14):12001-8.
 - Yanase K, Smith RM, Puccetti A, Jarett L, Madaio MP. Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-

- DNA antibodies via myosin 1. *J Clin Invest.* 1997 Jul 1;100(1):25-31.
- Youinou P, Serre G. The antiperinuclear factor and antikeratin antibody systems. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995 Aug;107(4):508-18.
 - Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J.* 1979 Jul 14;2(6182):97-9.
 - Zhang J, Dai J, Zhao E, Lin Y, Zeng L, Chen J, Zheng H, Wang Y, Li X, Ying K, Xie Y, Mao Y. cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type VI. *Acta Biochim Pol.* 2004;51(4):1051-8.
 - Zlatanova JS, Srebrevna LN, Banchev TB, Tasheva BT, Tsanev RG. Cytoplasmic pool of histone H1 in mammalian cells. *J Cell Sci.* 1990 Jul;96 (Pt 3):461-8.

