



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

**Facoltà di Medicina e Chirurgia**

**Scuola di Specializzazione in Allergologia e Immunologia Clinica**

TESI DI SPECIALIZZAZIONE

***“Anticorpi specifici per le acquaporine nelle malattie autoimmuni”***

**Relatore**

**Prof.ssa Paola Migliorini**

**Candidato**

**Dott.ssa Grazia M. L. Rizzelli**

Anno Accademico 2010-2011

*“Chiedetelo a qualunque medico e saprà indicarvi l’istante esatto in cui è diventato medico. Generalmente non è il giorno della laurea in medicina. E qualunque esso sia, nessuno lo dimentica. Quel momento non si può dimenticare. Scatta l’interruttore, improvvisamente non stai più giocando a metterti il camice: il camice bianco ti appartiene. Ciò che potresti non notare è che essere un dottore ti cambia.”*

## INDICE

ABSTRACT .....	4
1. ACQUAPORINE: DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE.....	5
2. L'ACQUAPORINA-4 E LE MALATTIE AUTOIMMUNI: LA NEUROMIELITE OTTICA .....	10
2.1 NEUROMIELITE OTTICA E SCLEROSI MULTIPLA.....	15
2.2 QUADRI CLINICI NELLA NMO.....	17
2.3 DIAGNOSI NMO .....	19
2.4 NMO E MALATTIE AUTOIMMUNI.....	21
3. SCOPO DELLA TESI.....	23
4. MATERIALI E METODI.....	24
5. RISULTATI .....	27
6. CONCLUSIONI .....	33
BIBLIOGRAFIA.....	35

## **ABSTRACT**

In questo lavoro di tesi si è affrontato il ruolo delle acquaporine come antigeni nelle malattie autoimmuni.

In particolare è stato esaminato il ruolo diagnostico e prognostico degli anticorpi anti-aquaporina-4 nella neuromielite ottica, soprattutto per quanto riguarda la diagnosi differenziale con la sclerosi multipla.

La presenza di autoanticorpi anti-aquaporina-4 è stata valutata in alcune malattie autoimmuni sistemiche (lupus eritematoso sistemico, sindrome di Sjogren) e nella malattia di Meniere mediante test immunoenzimatici basati su peptidi sintetici in fase solida.

I risultati indicano che in una piccola percentuale di sieri di lupus (13%) sono presenti anticorpi anti-aquaporina4. Gli anticorpi sono presenti quasi esclusivamente nei pazienti in fase attiva di malattia.

Gli anticorpi anti-aquaporina potrebbero quindi costituire una nuova specificità autoanticorpale nel lupus.

## 1. ACQUAPORINE: DEFINIZIONE E CLASSIFICAZIONE

Le aquaporine (AQP) sono proteine integrali di membrana appartenenti alla famiglia delle MIP (Major Intrinsic Protein); sono proteine transmembrana che consentono il passaggio bidirezionale di molecole d'acqua e altri ioni. (1)

Hanno un peso molecolare fra i 26 e i 34 kDa.

Si distinguono due famiglie di acquaporine:

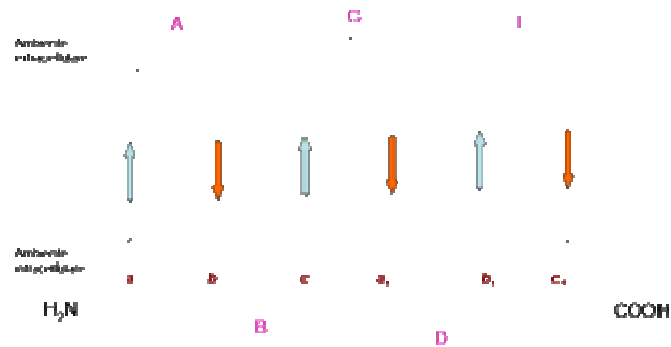
- *Acquaporine specifiche*: consentono solo il trasporto dell'acqua; il canale di trasporto è costituito esclusivamente da amminoacidi, i quali legano le molecole d'acqua impedendo il passaggio di altri ioni e molecole.

- *Acquaglicoproteine*: anche queste favoriscono il passaggio dell'acqua ma, a differenza delle aquaporine specifiche, consentono anche il passaggio di glicerolo e di altre molecole neutre.

La differenza tra le due famiglie di acquaporine sta nella configurazione amminoacidica interna del canale di trasporto. Per entrambe le famiglie il canale è costituito da cinque porzioni (P1, P2, P3, P4, P5), ciascuna con una specifica sequenza di amminoacidi. A seconda della sequenza di queste porzioni potrà passare solo l'acqua o acqua unita ad altre molecole.

In generale la struttura molecolare delle acquaporine è rappresentata da un "modello a clessidra" (Fig. 1.1). Si tratta di 6 domini proteici trans membrana uniti da 5 anse di connessione, con le terminazioni NH<sub>2</sub>- e COOH- rivolte verso l'ambiente intracellulare,

immerse nel citoplasma. Si tratta di 3 anse extracellulari (A, C, E) e 2 anse intracellulari (B e D). In particolare le anse B ed E si ripiegano a formare il poro canale. Tali anse possiedono residui amminoacidici specifici, detti "NPA" dalle sigle che identificano gli amminoacidi che li compongono (asparagina-prolina-alanina).



**Fig 1.1- struttura a clessidra**

Le anse A e B sono opposte; la prima ansa non presenta amminoacidi che legano le molecole d'acqua, funziona da elica che direziona la molecola stessa verso la seconda ansa con la quale si lega. Il legame che si forma è un legame idrogeno tra l'ossigeno e gli amminoacidi carichi positivamente, in particolare l'asparagina76 (Asn76) e l'asparagina192 (Asn192); l'ossigeno può legarsi con un amminoacido alla volta o con i due amminoacidi contemporaneamente.

Un altro residuo amminoacidico che riveste un ruolo fondamentale all'interno della struttura delle acquaporine è quello della cisteina, importante dal punto di vista del

meccanismo inibitorio. Tale amminoacido presenta un gruppo –SH, il quale viene attaccato da inibitori come il cloruro mercurico o il nitrato d'argento, che impediscono con il loro legame il passaggio delle molecole d'acqua.

Le acquaporine si assemblano nella membrana in forma tetrameric, tuttavia ogni monomero costituisce un'unità funzionale a sé, dotata del proprio poro per il passaggio dell'acqua.

Nell'uomo sono state identificate 11 acquaporine (AQP0-AQP10), presenti in tutti gli organi ma con localizzazione principale a livello del rene, del polmone, delle ghiandole salivari e dell'occhio, come riportato nelle tabelle che seguono:

<b><i>Acquaporine presenti nel rene</i></b>		
<b>ACQUAPORINA</b>	<b>LOCALIZZAZIONE</b>	<b>PERMEABILITA'</b>
Acquaporina 1	Tubulo contorto prossimale Tratto discendente ansa di Henle	Media
Acquaporina 3 Acquaporina 4	Dotto collettore	Bassa
Acquaporina 6	Dotto collettore	Comportamento anomalo
Acquaporina 7 Acquaporina 8	Tubulo contorto prossimale	Media
Acquaporina 2	Dotto collettore	Media

<b><i>Acquaporine presenti nell'apparato Respiratorio</i></b>	
<b>ACQUAPORINA</b>	<b>LOCALIZZAZIONE</b>
Acquaporina 1	Endotelio dei capillari Pleura viscerale
Acquaporina 3 Acquaporina 4	Trachea Bronchi Area naso-faringea
Acquaporina 5	Alveoli polmonari

<b><i>Acquaporine presenti nell'Occhio</i></b>	
<b>ACQUAPORINA</b>	<b>LOCALIZZAZIONE</b>
Acquaporina 0	Cristallino
Acquaporina 1	Sclera Cornea Iride
Acquaporina 3	Congiuntiva
Acquaporina 4	Retina
Acquaporina 5	Ghiandola lacrimale



La localizzazione principale delle acquaporine è a livello renale. A seconda del distretto considerato avremo un tipo diverso di acquaporina, con diverso grado di permeabilità. L'acquaporina che riveste un ruolo predominante nel riassorbimento dell'acqua è l'acquaporina-2, localizzata a livello del dotto collettore. La sua attività è regolata dall'azione della vasopressina (ormone antidiuretico). In condizioni di ipovolemia il maggiore rilascio di vasopressina determina un incremento dell'attività dell'acquaporina-2 e quindi un maggior riassorbimento di acqua. Il deficit congenito della stessa è responsabile della comparsa di diabete insipido. (2)

## **2. L'ACQUAPORINA-4 E LE MALATTIE AUTOIMMUNI: LA NEUROMIELETTITE OTTICA**

Fin dalla loro scoperta, è stato ipotizzato un possibile ruolo delle acquaporine nella patogenesi di diverse patologie; in particolar modo quelle nella cui patogenesi fossero coinvolti meccanismi autoimmunitari, come ad esempio la Neuromielite ottica di Devic, il LES, la Sindrome di Sjogren, la malattia di Meniere.

La Neuromielite ottica di Devic (NMO) è una malattia infiammatoria demielinizzante e necrotizzante del SNC che interessa selettivamente il nervo ottico e il midollo spinale. Recenti studi suggeriscono alla base di tale patologia la presenza di un meccanismo immunitario.

Le biopsie e le autopsie post-mortem del tessuto cerebrale di pazienti affetti da NMO mostrano lesioni di tipo necrotico, con infiltrati neutrofilici ed eosinofili, depositi di immunoglobuline e frazioni del complemento sulla parete dei vasi. Tali dati confermerebbero il possibile coinvolgimento del sistema immunitario (3).

Le anomalie della regione perivascolare, quindi con infiltrazione di macrofagi, deposito di complemento e immunoglobuline e successiva ialinizzazione vascolare, hanno portato gli autori a identificare nello spazio perivascolare il sito di destinazione primaria del processo patogeno.

Il ruolo di target immunitario sarebbe rivestito dall'acquaporina-4 (AQP4).

Nella maggior parte dei pazienti con NMO (circa 75%) infatti, si riscontra elevato titolo di un anticorpo specifico (NMO IgG), anticorpo che riconosce come auto antigene proprio l'acquaporina-4. (4,3)

L'acquaporina-4 (AQP4) è una proteina trans membrana di tipo III; costituisce il principale meccanismo per il passaggio dell'acqua trans membrana a livello del cervello, del midollo spinale, della retina, dell'orecchio interno e della muscolatura.

E' l'acquaporina più abbondante nel cervello dei mammiferi; è espressa a maggiori concentrazioni in prossimità della barriera emato-encefalica e a livello dei pedicelli degli astrociti. E' inoltre presente a livello delle cellule ependimali e, a più basse concentrazioni, a livello delle cellule endoteliali del tessuto cerebrale, dei nuclei sovraottici dell'ipotalamo e delle strutture periventricolari.

Sui pedicelli degli astrociti l'AQP4 è associata al canale per il potassio (Kir 4.1), che è coinvolto nella regolazione della concentrazione del K extracellulare (5). Inoltre la sua localizzazione è anche associata alla molecola coinvolta nel trasporto del glutammato (GLT-1). Il glutammato rappresenta uno dei principali amminoacidi eccitanti degli astrociti (6).

Tale localizzazione strategica, in associazione a Kir 4.1 e GLT-1, a livello perivascolare e subependimale, conferisce all'AQP4 un ruolo potenziale di severo danno a livello di mielina e assoni di aree cerebrali vulnerabili, come ad esempio il nervo ottico o il midollo spinale (7).

Significativo anche il dato che la distribuzione delle aree ricche di AQP4 nel SNC (la parte centrale del midollo spinale, l'ipotalamo, le aree periventricolari e periacquoduttali) ha un' alta corrispondenza con la localizzazione delle lesioni nella NMO.

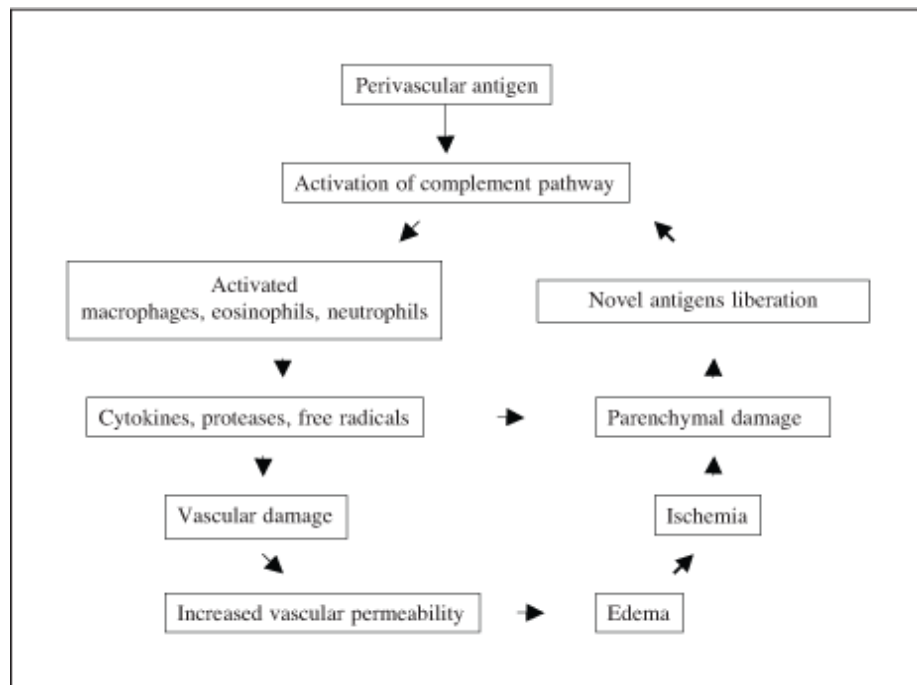
Finora sono state evidenziate due isoforme di AQP4: M1 e M23, che differiscono per 23 aminoacidi. Sembrerebbe che gli Ab NMO-IgG leghino con maggiore avidità l'isoforma più corta M23. (8,9,10)

Per determinare se tale antigene è limitato al SNC, il siero dei pazienti positivi per NMO-IgG è stato testato con immunofluorescenza indiretta su sezioni di fegato, rene e stomaco di topi normali. In contrasto con l'intensa colorazione degli elementi piali a livello cerebrale, NMO-IgG non sembrano legarsi agli elementi vascolari o del sistema nervoso autonomo a livello di stomaco, rene o fegato. Quindi, la distribuzione dell'immunoreattività dei sieri dei pazienti con NMO, prevalente a livello del SNC, confermerebbe il ruolo dell'AQP4 come possibile Ag bersaglio nella patogenesi della malattia.

L'Ab NMO-IgG, quindi, ad oggi è considerato il marker sierologico della NMO con una sensibilità del 73% ed una specificità del 91%

Dal punto di vista patogenetico, il legame tra l'Ab IgG-NMO e l'autoAg AQP4 innesca la cascata del complemento (11) e, quindi, la chemiotassi dei macrofagi che, insieme a eosinofili e neutrofilo, localmente determinano il rilascio di citochine (IL-17 e IL-8), proteasi e radicali liberi che contribuiscono al danno sia vascolare che parenchimale. Il danno coinvolge sia la materia grigia che bianca, includendo assoni e oligodendrociti (12). Inoltre, l'aumento della permeabilità vascolare, in seguito al danneggiamento delle strutture vascolari, può determinare la comparsa di edema con conseguente ischemia secondaria e ulteriore danno parenchimale (Fig.2.1).

L'apoptosi cellulare che ne deriva inoltre provoca la liberazione di altri AutoAg. Nei sieri dei pazienti affetti da NMO si riscontrano infatti anche Ab diretti verso altri Ag intra ed extracellulari presenti nel tessuto cerebrale (es. proteina basica della mielina, S100beta, CPSF-73). Questi AutoAb potrebbero non essere implicati nelle prime fasi della patologia, ma potrebbero avere un ruolo nella patogenesi della ricorrenza degli episodi della stessa innescando reazioni di ipersensibilità di tipo III (13).



**Fig.2.1 - Patogenesi NMO**

Gli Ab NMO-IgG sembrerebbero essere prodotti perifericamente in seguito ad uno stimolo antigenico non noto; ma in che modo sono in grado di raggiungere gli astrociti per interagire con AQP4?

In condizioni normali la barriera ematoencefalica è altamente impermeabile alle proteine plasmatiche; questo protegge il SNC da possibili reazioni immunitarie. Ci sono distinte sedi anatomiche in cui la barriera emato-encefalica ha ridotta capacità di moderare l'accesso del siero e può quindi essere definita permissiva (14). Esempi possono essere la testa del nervo ottico oppure le cellule ependimali perimidollari e ventricolari (15). Tale permeabilità può ulteriormente essere alterata direttamente dalle cellule T attivate per l'autoAg AQP4; il risultato che si ottiene è una maggiore concentrazione di anticorpi antiAQP4 e di altri effettori del sistema immunitario a livello del SNC (16).

La sintesi periferica di NMO-IgG spiega la mancanza di bande oligoclonali all'analisi del liquido cerebrospinale in contrasto con quanto avviene nella SM, dove il reclutamento di cellule B dalla periferia permette la produzione intratecale di anticorpi. Questo meccanismo giustificherebbe anche l'ottima risposta di questi pazienti alla plasmaferesi.

In una percentuale che varia dal 5% al 40% di pazienti affetti da NMO, gli Ab antiAQP4 sono assenti (17,18,19).

In modelli animali sperimentali è stato recentemente visto che la risposta immune diretta contro la glicoproteina della mielina oligodendrocitica (MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein) può indurre quadri clinici simili alla NMO.

In questi pazienti quindi, la MOG potrebbe essere un auto antigene alternativo all'AQP4 in grado di innescare gli stessi meccanismi patogenetici.

## 2.1 NEUROMIELITE OTTICA E SCLEROSI MULTIPLA

La distinzione tra Sclerosi Multipla e Neuromielite ottica è stata a lungo poco chiara.

Fino all'inizio degli anni '90 la NMO era considerata una patologia ad andamento strettamente monofasico, caratterizzato da episodi di neurite ottica retrobulbare bilaterale (NORB) e successiva mielite trasversa acuta, responsabili di cecità e paraplegia.

La descrizione di casi clinici di pazienti con quadri più sfumati e recidivanti ha portato negli anni seguenti a ritenere la NMO una variante remittente ottico-spinale di Sclerosi Multipla (OSSM).

Le pubblicazioni successive hanno permesso di smentire tale ipotesi.

La NMO rappresenta un'entità patologica a sé stante.

Nella maggior parte di casi le differenze più evidenti tra la NMO e la SM sono l'assenza di lesioni encefaliche evidenziabili all'RM encefalo (in particolar modo all'esordio) ed il dato che nella NMO l'interessamento midollare è più grave, con lesioni estese longitudinalmente per tre o più segmenti midollari contigui.

Molto interessanti i dati riguardanti la differente espressione di AQP4 nei pazienti affetti dalle due patologie.

Recenti studi hanno dimostrato una minor espressione di AQP4 nelle lesioni midollari dei pazienti con NMO, evidenziando il ruolo patogenetico dell'AQP4 in questa patologia; al contrario si evidenzia una maggior espressione della stessa a livello delle placche nei pazienti con SM e nei tessuti periplacca (20,21).

Lucchinetti et al (Roemer et al, 2007) hanno dimostrato, attraverso i loro studi, la perdita selettiva di AQP4 nelle lesioni dei pazienti con NMO ed hanno eseguito un interessante studio comparativo dettagliato con i pazienti affetti da SM. L'immunoreattività dell'AQP4 nelle lesioni della SM risultava variabile e dipendente dallo stadio di demielinizzazione, aumentata nella sostanza bianca periplacca e a livello degli astrociti di lesioni attive. Al contrario, l'immunoreattività dell'AQP4 risultava ridotta a livello delle lesioni di NMO inattive campionate sia da pazienti in fase acuta che cronica (22).



## 2.2 QUADRI CLINICI NELLA NMO

Al momento attuale, lo spettro della Neuromielite ottica di Devic include pazienti le cui caratteristiche cliniche possono essere classificate sotto almeno 7 diversi sottotipi fenotipici.

- 1) Classica: andamento monofasico caratterizzato da neurite ottica bilaterale e mielite acuta; non evidenza di lesioni cerebrali alla RMN encefalo;
- 2) Recidivante: attacchi ripetitivi di neurite ottica uni o bilaterale e mielite acuta. Rispetto alla forma monofasica, la NMO recidivante presenta delle caratteristiche distintive: una marcata preponderanza nel sesso femminile, maggiore età d'esordio, maggiore associazione con altre patologie autoimmuni, maggiore riscontro di AutoAb specifici.
- 3) Recidivante asintomatica con lesioni cerebrali alla RMN che non soddisfano i criteri diagnostici per la SM: le lesioni all'RM di questi pazienti sono aspecifiche, di solito coinvolgono tronco cerebrale e ipotalamo. La maggior parte di questi pazienti presentano positività per le IgG-NMO.
- 4) Recidivante asintomatica con lesioni cerebrali alla RMN che soddisfano i criteri diagnostici per la SM: questi pazienti sono nella totalità dei casi positivi per IgG-NMO e comprendono il 10% dei casi di SM recidivante NMO. Rappresentano lo spettro di condizioni come descritto da Shibasaki et al nel 1874, che va dalla malattia classica di Devic alla SM (23).
- 5) Recidivante con lesioni cerebrali sintomatiche: come disturbi della coscienza, agitazione, disturbi del movimento degli occhi, disartria.

6) Recidivanti in associazione ad altre malattie autoimmuni: presentano sintomatologia e profilo anticorpale riconducibili ad altre patologie autoimmuni (24).

7) Neurite ottica ricorrente isolata o Mielite acuta ricorrente isolata: si tratta di due forme ad alto rischio evolutivo sia verso la NMO, sia verso SM. In uno studio su 72 pazienti con neurite ottica ricorrente Pirko et al ha rilevato che a 5 aa il tasso di conversione a neuromielite ottica è stata del 12,5% e a sclerosi multipla del 14,4% (25).

## 2.3 DIAGNOSI NMO

Per quel che riguarda la diagnosi di malattia, Wingerchuk et al nel 1999 sulla base di dati clinici, di laboratorio e di imaging crearono i primi criteri diagnostici. (24) (Fig 2.2)

---

Diagnosis requires all absolute criteria and one major supportive criterion or two minor supportive criteria

**Absolute criteria**

1. Optic neuritis
2. Acute myelitis
3. No evidence of clinical disease outside of the optic nerve or spinal cord

**Supportive criteria**

**Major**

1. Negative brain MRI at onset (does not meet criteria for MS)
2. Spinal cord MRI with signal abnormality extending over  $\geq 3$  vertebral segments
3. CSF pleocytosis of  $>50$  WBC  $\text{mm}^3$  OR  $>5$  neutrophils/ $\text{mm}^3$

**Minor**

1. Bilateral optic neuritis
2. Severe optic neuritis with fixed visual acuity worse than 20/200 in at least one eye
3. Severe, fixed, attack-related weakness (MRC grade  $\leq 2$ ) in one or more limbs

---

**Fig. 2.2 - Wingerchuck et al's 1999 diagnostic criteria for neuromyelitis optica**

La diagnosi poteva essere formulata in presenza di tutti i criteri assoluti e di un criterio di supporto maggiore o di due minori.

In una successiva analisi di 96 pazienti con NMO, si evidenziava che tali criteri avevano una sensibilità dell'85% ma una bassa specificità, solo del 48%.

Lo stesso Wingerchuk quindi modificò tali criteri, inserendo in particolar modo la sieropositività di questi pazienti per gli Ab NMO-IgG, al fine di aumentarne la specificità (26) (Fig.2.3).

---

Definite neuromyelitis optica

Optic neuritis

Acute myelitis

At least two of three supportive criteria

1. Contiguous spinal cord MRI lesion extending over  $\geq 3$  vertebral segments
  2. Brain MRI not meeting diagnostic criteria for multiple sclerosis
  3. NMO-seropositive status
- 

**Fig.2.3 - Wingerchuck et al's revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica**

## 2.4 NMO E MALATTIE AUTOIMMUNI

La Neuromielite ottica è stata spesso associata ad altre malattie autoimmuni, sia sistemiche (LES, Sindrome di Sjogren) che organo-specifiche (Tiroidite di Hashimoto, Miastenia Gravis) e ancor più frequentemente alla presenza di autoanticorpi circolanti in assenza di manifestazioni cliniche a loro associate. Fig. 5

- 
- Systemic lupus erythematosus
  - Sjögren's syndrome
  - Mixed connective tissue disease
  - Hypothyroidism
  - Myasthenia gravis
  - Polyarteritis nodosa
  - Pernicious anemia
  - Ulcerative colitis
  - Primary sclerosing cholangitis
  - Idiopathic thrombocytopenic purpura
  - Antinuclear antibodies
  - Anti-SSA and anti-SSB antibodies
  - Anticardiolipin antibodies
  - Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies (p-ANCA)
  - Anti-thyroid peroxidase antibodies
- 

**Fig.2.4 - Autoimmune disorders associated with neuromyelitis optica**

Gli Ab NMO-IgG vengono rilevati nella maggior parte dei sieri di pazienti con concomitante NMO o sindromi NMO parziali e LES o Sindrome di Sjogren, ma non nel siero di pazienti con LES e Sindrome senza impegno neurologico (27,28).

Questo conferma ulteriormente come IgG-NMO possa essere considerato marker specifico di NMO.

In uno studio del 2010 di Wandinger et al pubblicato su Arthritis & Rheumatism è stata valutata la significatività di NMO-IgG come potenziale marker di impegno neurologico

nelle malattie autoimmuni. Sono stati studiati i sieri di 48 pazienti affetti da LES e 44 da Sindrome di Sjogren, rispettivamente 28 e 22 con manifestazioni neurologiche. Gli Ab NMO-IgG sono stati riscontrati esclusivamente nei pazienti che presentavano, come manifestazione neurologica, la neuromielite trasversa o la neurite ottica. Non sono stati mai riscontrati nei pazienti con altri tipi di manifestazioni neurologiche o neuropsichiche o con altri impegni d'organo.

Questi dati dimostrerebbero che gli NMO-IgG non possono essere utilizzati come marker di impegno neurologico nei pazienti con LES e SS. Inoltre confermerebbero la stretta correlazione tra questi anticorpi e le due manifestazioni principali della NMO, la mielite trasversa e la neurite ottica.

In questo studio infine si suggerisce come il dosaggio degli Ab anti-AQP4 possa avere un ruolo nell'indirizzare le scelte terapeutiche. Mentre infatti nei pazienti affetti da SM si preferisce l'utilizzo di terapie immunomodulanti, nei pazienti affetti da NMO vi è l'indicazione all'utilizzo precoce di terapie immunosoppressive, in particolar modo quelle terapie che abbiano come target le cellule B. Nei pazienti quindi con LES e SS e coinvolgimento neurologico andrebbero sempre dosati gli Ab antiAQP4 al fine di discriminare un piccolo ma significativo sottogruppo di pazienti in cui è razionale utilizzare le stesse strategie terapeutiche dell'NMO, con lo scopo di evitare persistente disabilità neurologica (29).

### **3. SCOPO DELLA TESI**

Lo scopo di questa tesi è quello di valutare il ruolo delle aquaporine come antigeni nelle malattie autoimmuni.

In particolare abbiamo esaminato il ruolo diagnostico e prognostico degli anticorpi anti-aquaporina4 nella neuromielite ottica, soprattutto per quanto riguarda la diagnosi differenziale con la sclerosi multipla.

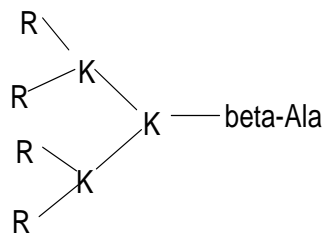
Inoltre la presenza di autoanticorpi anti-aquaporina-4 è stata valutata in alcune malattie autoimmuni sistemiche (lupus eritematoso sistemico, sindrome di Sjogren) e nella malattia di Meniere mediante test immunoenzimatici basati su peptidi sintetici in fase solida, al fine di valutare il possibile ruolo di tale anticorpo come marker specifico di malattia.

#### 4. MATERIALI E METODI

E' stata valutata la presenza di anticorpi anti-AQP4 nei sieri di pazienti affetti da patologie autoimmuni a confronto con sieri di soggetti sani.

La presenza in tali sieri di Anticorpi diretti contro l'AQP4 è stata ricercata attraverso l'utilizzo di due diversi peptidi estratti dalla struttura dell'isoforma M1 dell'AQP4.

Il primo peptide testato, MAP, è un peptide antigenico multiplo. I peptidi sono legati attraverso il gruppo carbossilico terminale ad una matrice nucleo di 4 o 8 ramificazioni di Lisina, che viene definito MAPcore.



**Fig. 4.1 - MAP**

Il secondo peptide testato è invece un peptide lineare EP2, che corrisponde al loop E della molecola

Con i peptidi MAP sono stati testati i sieri di 44 pazienti: 15 controllori sani, 24 pazienti affetti da LES, 4 da Sindrome di Sjogren, 1 da Connettivite Indifferenziata.



Con il peptide EP2 sono stati testati 188 sieri: 51 controlli sani, 54 pazienti affetti da LES, 39 da Artrite Reumatoide, 34 da Sindrome di Sjogren, 9 da Sclerodermia, 1 da Connettivite Indifferenziata.

Infine sono stati misurati i livelli di anticorpi in 80 soggetti affetti da malattia di Meniere.

La metodica utilizzata è un test ELISA.

Sono state utilizzate piastre da 96 pozzetti NUNC Maxisorp, sulle quali si è effettuato il coating dei peptidi, previamente diluiti in tampone fosfato (PBS a pH 7,4), alla concentrazione di 20 µg/ml, caricandone un volume di 50 µl per pozzetto.

Dopo l'incubazione della durata di una notte, le piastre sono state caricate con 50 µl per pozzetto della soluzione di blocco PBS- BSA 3%, e lasciate di nuovo ad incubare per 1 ora.

I sieri sono stati diluiti 1:100 in PBS-BSA1% Tween 0.05%. Dopo rimozione del tampone di blocco per semplice sbattimento, le piastre sono state caricate con le varie concentrazioni degli anticorpi (ciascuna in doppio), con un volume di 50 µl per pozzetto. Poi sono state lasciate ad incubare per 2,5 h a temperatura ambiente.

Dopo tre lavaggi, di cui uno effettuato con PBS Tween 20 1% e due con PBS, è stato aggiunto l'anticorpo secondario, un anticorpo anti immunoglobuline umane coniugato con la fosfatasi alcalina diluito in rapporto 1:3000 nello stesso tampone degli anticorpi purificati. Trascorso un periodo di 2,5 h per l'incubazione a temperatura ambiente, si sono effettuati i 3 lavaggi con lo stesso metodo sopra descritto, e lo sviluppo delle

piastre con il substrato della fosfatasi alcalina e  $MgCl_2$  diluiti in tampone carbonato a pH 9,6.

Il legame peptide-anticorpo è stato quantificato con lettura spettrofotometrica a 405 nm.

## 5. RISULTATI

Il dosaggio degli anticorpi diretti contro i peptidi MAP utilizzati non ha messo in evidenza una differenza statisticamente significativa tra i controlli sani e i pazienti affetti da patologie autoimmuni, come si evidenzia nelle figure riportate.

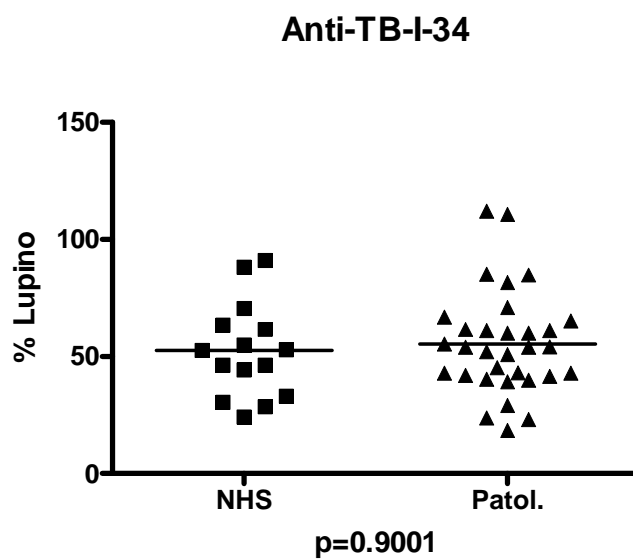


Fig.5.1 - MAP AQP4 (1-20)

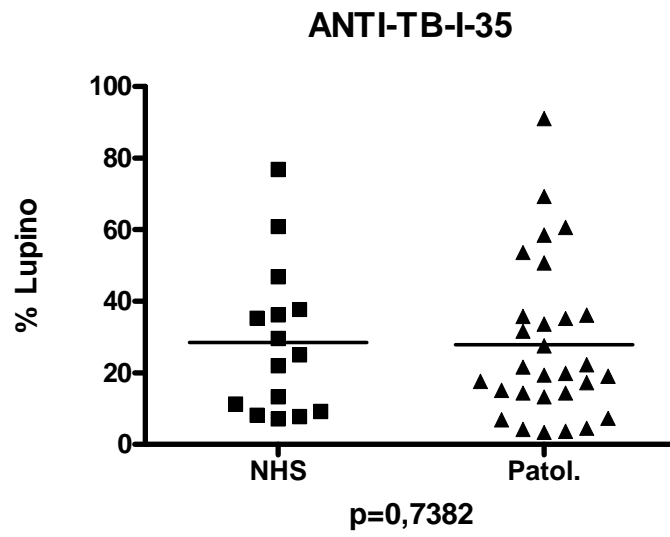


Fig. 5.2 - MAP [Asn (Glc)153] AQP4 (137-156)-Loop C

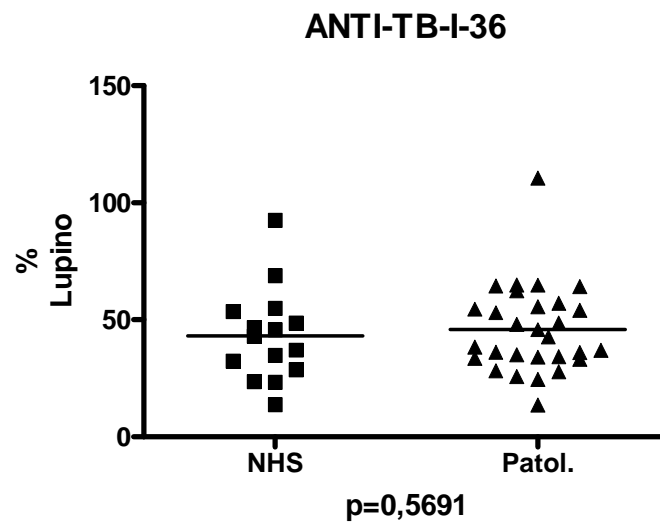


Fig. 5.3 - MAP AQP4(216-225)-Loop E

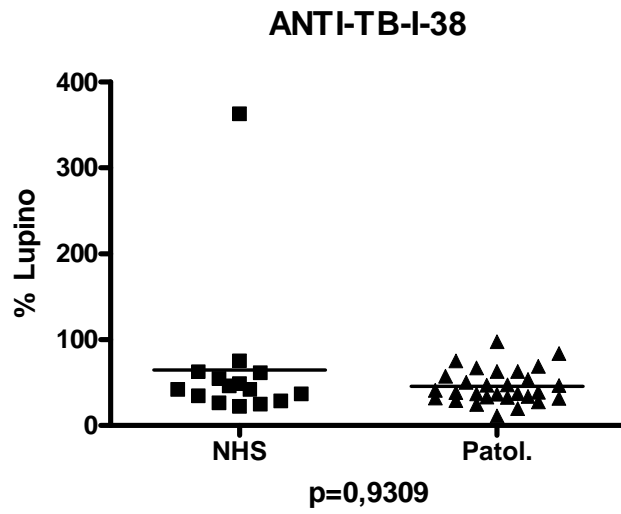


Fig. 5.4 - MAP AQP 4 (206-221)- Loop E

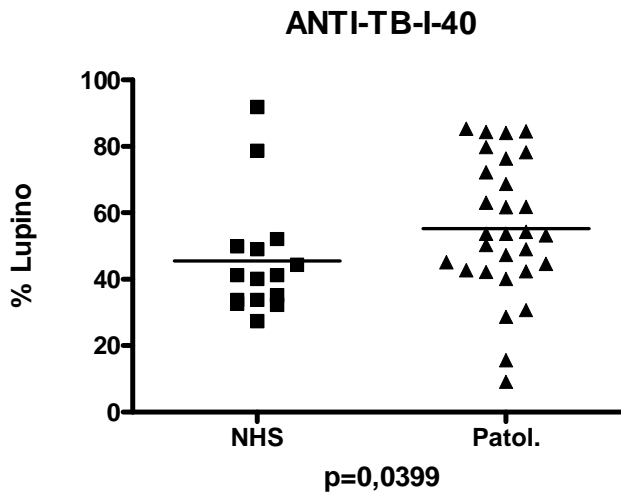


Fig. 5.5 - MAP AQP 4 (1-15)

### ANTI-TB-I-41\_bis

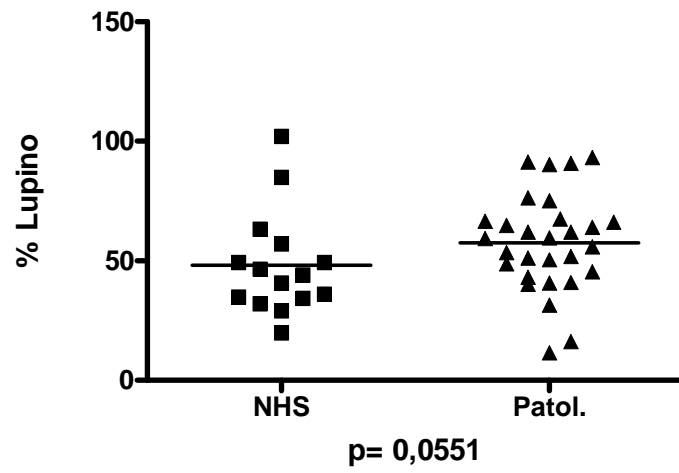


Fig. 5.6 - MAP AQP 4 (8-22)

### ANTI-TB-I-42

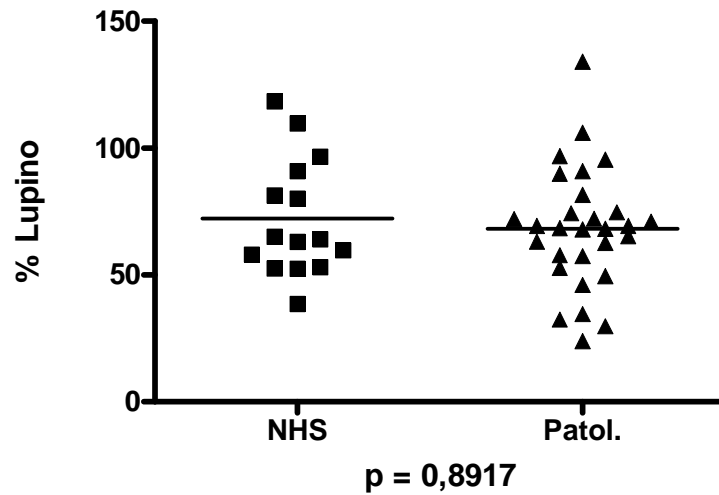


Fig. 5.7 - MAP AQP 4 (16-30)

Al contrario di quello accaduto con i MAPS, testando i sieri con il peptide lineare EP2, si è evidenziata una differenza statisticamente significativa della positività anticorpale tra i controlli sani e i pazienti affetti da Lupus Eritematoso sistemico, con una  $p < 0.0001$ . Differenze significative anche se di grado inferiore sono state osservate con i sieri dei pazienti affetti da AR e da Sclerodermia (Fig. 5.8).

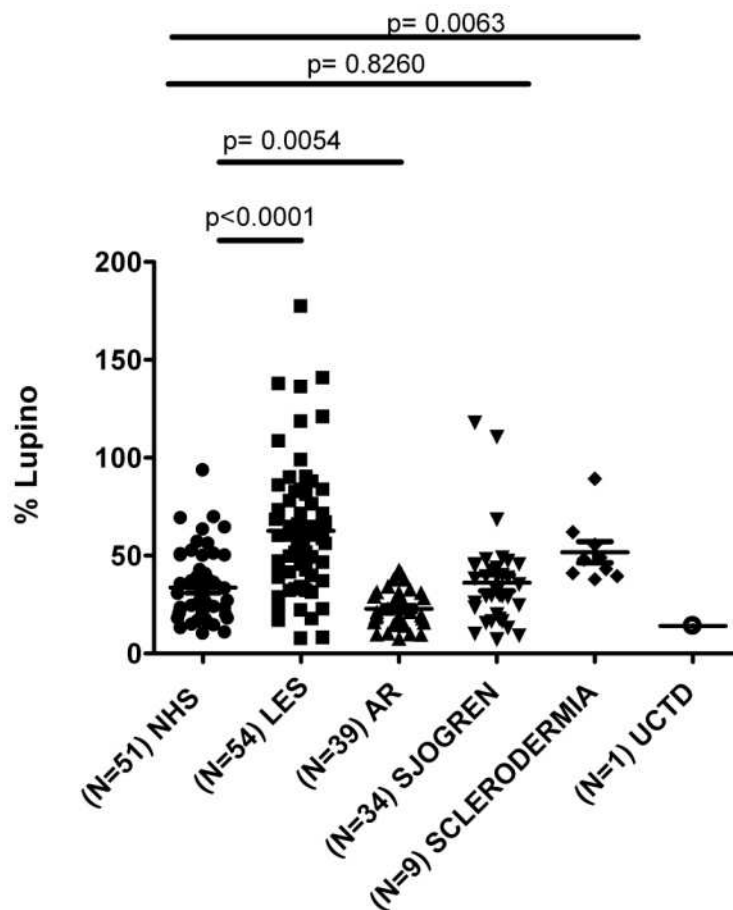


Fig. 5.8 – EP2

Infine nei sieri dei pazienti con malattia di Meniere non sono evidenziabili anticorpi né contro i MAP né contro EP2.

Abbiamo successivamente valutato le caratteristiche cliniche di 22 pazienti affetti da LES, 9 con un elevata percentuale di positività al test ELISA per gli Ab anti AQP4 e 10 con una bassa positività.

Si tratta di 22 donne, affette da LES, con un età media di 37 anni (21; 66).

I dati emersi sono piuttosto eterogenei.

Non sembra esserci una correlazione con uno specifico impegno d'organo.

L'impegno renale è presente nel 70% dei pazienti con un alta positività per gli Ab antiAQP4 e nel 66.6% dei pazienti negativi. L'impegno del SNC è presente nel 10% dei pazienti positivi e nel 20% di quelli negativi.

L'unico dato interessante da riportare è che nel gruppo dei positivi si ha una maggiore percentuale di pazienti con malattia attiva; 80% contro 50%.



## 6. CONCLUSIONI

I dati ottenuti indicano che nei pazienti con malattie autoimmuni è dimostrabile una risposta immune contro l'acquaporina 4, che è rivolta solo contro una porzione della molecola corrispondente ad una delle anse extracellulari. Al contrario, non sono stati evidenziati anticorpi nei soggetti con malattia di Meniere, in cui è stato ipotizzato che l'idrope endolinfatica possa dipendere da una disfunzione del sistema delle acquaporine. Poiché nella malattia di Meniere è stata suggerita una patogenesi autoimmune, abbiamo voluto testare l'esistenza di una risposta anticorpale contro i peptidi dell'acquaporina 4, ma i risultati sono stati negativi. Resta la possibilità che altre isoforme possano essere target degli autoanticorpi (anche se proprio la 4 è espressa nell'orecchio interno) oppure che la risposta anticorpale sia diretta contro determinanti conformazionali che non sono riprodotti nei peptidi sintetici.

Al contrario, in alcune malattie autoimmuni i peptidi sintetici dell'acquaporina 4 sono riconosciuti da anticorpi IgG. I pazienti con LES hanno anticorpi anti-acquaporina con maggior frequenza e con titolo più alto, ma anche nei soggetti con sindrome di Sjogren o Sclerodermia si osservano differenze, ancorché non statisticamente significative, rispetto ai controlli. Non si tratta quindi di anticorpi marker di malattia.

Con il limite dello scarso numero dei dati valutati, la presenza degli Ab antiAQP4 nei pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico è prevalente nei soggetti in fase attiva di malattia.

Gli Ab antiAQP4 potrebbero rappresentare una nuova specificità autoanticorpale nei sieri di pazienti affetti da Lupus, la cui produzione potrebbe essere legata alla riattivazione di malattia.

Nel corso di ulteriori studi verrà testata la loro prevalenza in soggetti affetti da LES ed impegno neurologico e/o oftalmico ed il loro titolo nelle varie fasi di attività di malattia.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Yool AJ, Campbell EM., Structure, function and translational relevance of aquaporin dual water and ion channels., Mol Aspects Med. 2012 Feb 11. [Epub ahead of print]
2. Knepper MA, Inoue T, Regulation of aquaporin-2 water channel trafficking by vasopressin., Curr Opin Cell Biol. 1997 Aug;9(4):560-4.
3. Wingerchuchuk DM, evidence for humoral autoimmunity in neuromyelitis optica Neurology 2006;28:348-353
4. Evangelopoulos ME, Koutsis G, Andreadou E, Potagas C, Dimirakopoulos A, Sfago C., Neuromyelitis optica spectrum disease with positive autoimmune indices: a case report and review of the literature., Case Report Med. 2011;2011:393568. Epub 2011 Nov 1.
5. Naggelhus EA, Horio Y, Inanobe A, et al. Immunogold evidence suggests that coupling of K<sup>+</sup> siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. Glia 1999;26:47-54.

6. Zeng XN, Sun XL, Gao L, Fan Y, Ding JH, Hu G. Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 2007;34:34-39.
7. Griesdale DE, Honey CR. Aquaporins and brain edema. *Surg Neurol* 2004;61:34-39.
120. Manley GT, Fujimara
8. Saini H, Fernandez G, Kerr D, Levy M., Differential expression of aquaporin-4 isoforms localizes with neuromyelitis optica disease activity, *J Neuroimmunol.* 2010 Apr 15;221(1-2):68-72. Epub 2010 Mar 15.
9. Nicchia GP, Mastrototaro M, Rossi A, Pisani F, Tortorella C, Ruggieri M, Lia A, Trojano M, Frigeri A, Svelto M: Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies. *Glia* 2009, 57(13):1363-1373.
10. Mader S, Lutterotti A, Di Pauli F, Kuenz B, Schanda K, Aboul-Enein F, Khalil M, Storch MK, Jarius S, Kristoferitsch W, Berger T, Reindl M: Patterns of antibody binding to aquaporin-4 isoforms in neuromyelitis optica. *PLoS One* 2010, 5(5):e10455.

11. Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D, et al. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 2002;125:1450-1461.
12. Mader S, Gredler V, Schanda K, Rostasy K, Dujmovic I, Pfaller K, Lutterotti A, Jarius S, Di Pauli F, Kuenz B, Ehling R, Hegen H, Deisenhammer F, Aboul-Enein F, Storch MK, Koson P, Drulovic J, Kristoferitsch W, Berger T, Reindl M., Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders., *J Neuroinflammation*. 2011 Dec 28;8:184.
13. David J Graber<sup>1</sup>, Michael Levy<sup>2</sup>, Douglas Kerr<sup>2</sup> and William F Wade<sup>\*3</sup>, Neuromyelitis optica pathogenesis and aquaporin 4, Review
14. Guy J, Rao NA: Acute and chronic experimental optic neuritis, Alteration in the blood-optic nerve barrier. *Arch Ophthalmol* 1984, 102:450-4.
15. Lack of blood-brain barrier properties in microvessels of the prelaminar optic nerve head. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001, 42:895-901.
16. Melamud L, Fernández JM, Rivarola V, Di Giusto G, Ford P, Villa A, Capurro C. Neuromyelitis Optica Immunoglobulin G present in sera from neuromyelitis optica patients affects aquaporin-4 expression and water permeability of the astrocyte

plasma membrane. *n J Neurosci Res*. 2012 Feb 22. doi: 10.1002/jnr.22822. [Epub ahead of print

17. Jarius S, Frederikson J, Waters P, Paul F, Akman-Demir G, Marignier R, Franciotta D, Ruprecht K, Kuenz B, Rommer P, Kristoferitsch W, Wildemann B, Vincent A: Frequency and prognostic impact of antibodies to aquaporin-4 in patients with optic neuritis. *J Neurol Sci* 2010, 298(1-2):158-162.

18. Takahashi T, Fujihara K, Nakashima I, Misu T, Miyazawa I, Nakamura M, Watanabe S, Shiga Y, Kanaoka C, Fujimori J, Sato S, Itoyama Y: Antiaquaporin- 4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: a study on antibody titre. *Brain* 2007, 130(Pt 5):1235-1243.

19. Jarius S, Franciotta D, Bergamaschi R, Wildemann B, Wandinger KP: Immunoglobulin M antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders. *Clin Chem Lab Med* 2010, 48(5):659-663.

20. Misu T, Fujihara K, Nakamura M, et al. Loss of aquaporin-4 in active perivascular lesions in neuromyelitis optica: a case report. *Tohoku J Exp Med*. 2006;209:269-

21. Sinclair C, Kirk J, Herron B, Fitzgerald U, McQuaid S. Absence of aquaporin-4 expression in lesions of neuromyelitis optica but increased expression in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter. *Acta Neuropathol* 2007;113:187-194.
  
22. Klawiter EC, Xu J, Naismith RT, Benzinger TL, Shimony JS, Lancia S, Snyder AZ, Trinkaus K, Song SK, Cross AH., Increased radial diffusivity in spinal cord lesions in neuromyelitis optica compared to multiple sclerosis., *Mult Scler*. 2012 Feb 21. [Epub ahead of print]
  
23. Shibasaki H, Kuroda Y, Kuoroiwa Y. Clinical studies of multiple sclerosis in Japan: classical multiple sclerosis and Devic's disease. *J Neurol Sci* 1974;23:215-222.
  
24. Wingerchuk DM, Hogancamp WF, O'Brien PC, Weinshenker BG. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 1999;53:1107-1114
  
25. Pirko I, Blauwet LK, Lesnick TG, Weinshenker BG. The natural history of recurrent optic neuritis. *Arch Neurol* 2004;61:1401-1405.

26. Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG: Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 2006, 66(10):1485-1489.
27. Pittock SJ, Lennon VA, de Seze J, Vermersch P, Homburger HA, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Zephir H, Moder K, Weinshenker BG: Neuromyelitis optica and non organ-specific autoimmunity. *Arch Neurol* 2008, 65:78-83.
28. Weinshenker B, Seze J, Vermersch P, Pittock S, Lennon V: The Relationship between Neuromyelitis Optica and Systemic Autoimmune Disease: S52.003: 4:15 PM. *Neurology* 2006, 66:A380-1.
29. CONCISE COMMUNICATION, Autoantibodies against aquaporin-4 in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus and primary Sjögren syndrome, *ARTHRITIS & RHEUMATISM*, Vol. 62, No. 4, April