



UNIVERSITA' DI NAPOLI FEDERICO II



Comunità Europea
Fondo Sociale Europeo

**DOTTORATO IN
BIOCHIMICA E BIOLOGIA CELLULARE E
MOLECOLARE**

TESI DI DOTTORATO, 2007

**LA POLI-ADPRIBOSILAZIONE NEI SIERI DI PAZIENTI
AFFETTI DA MALATTIE AUTOIMMUNI (LES): STUDIO
DELLE POTENZIALITÀ DIAGNOSTICHE DI UN TERMOZIMA
ADP-RIBOSILANTE DA *SULFOLOBUS SOLFATARICUS***

DOTTORANDA:

**ANNA PETRELLA
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA
STRUTTURALE E FUNZIONALE**

RELATORE:

Prof.ssa BENEDETTA FARINA

COORDINATORE:

Prof. GIUSEPPE D' ALESSIO

*Non so quando,
ma so che in tanti siamo venuti in questo secolo per sviluppare arti e scienze,
porre i semi della nuova cultura che fiorirà, inattesa, improvvisa,
proprio quando il potere si illuderà di avere vinto.*

Giordano Bruno

Alle giovani e promettenti menti scientifiche oscurate da sistemi vecchi e corrotti.

INDICE

INTRODUZIONE	
IL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO	1
SCOPO, FASI ED ARTICOLAZIONE DELLA RICERCA	6
I CAPITOLO	
DEFINIZIONE DELLE CONDIZIONI DI ANALISI DELLA PARPS_{So} CON ANTICORPI ANTI-PARP	8
MATERIALI E METODI	
I. 1 Crescita del microrganismo e purificazione della proteina PARPS _{So}	9
I. 2 Preparazione dell' estratto nucleare grezzo da testicoli di mammifero	9
I. 3 Analisi elettroforetica delle proteine, western-blot e immunorivelazione con anticorpi anti-PARP	10
I. 4 Immobilizzazione dell' antigene su supporti diversi	11
I. 5 Immunorivelazione di proteine immobilizzate mediante dot-blot	11
RISULTATI	
I. 6 Specificità e stabilità antigenica dell' enzima PARP eucariotico e della PARPS _{So}	13
I. 7 Scelta del supporto di immobilizzazione dell' antigene	15
I. 8 Capacità antigeniche della PARPS _{So} nei confronti di anticorpi commerciali	16
CONCLUSIONI	18
II CAPITOLO	
CAPACITÀ ANTIGENICHE DELLA PARPS_{So} CON SIERI DI PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIE AUTOIMMUNI	19
MATERIALI E METODI	
II. 1 Raccolta dei campioni di siero	21
II. 2 Immobilizzazione della PARPS _{So} e analisi dei sieri, a diverse diluizioni, mediante dot-blot	21
II. 3 Determinazione di autoanticorpi presenti nei sieri, a concentrazioni differenti di antigene	22
II. 4 Specificità di legame degli autoanticorpi presenti nei sieri, in presenza di antigene non purificato	22
II. 5 Attendibilità del saggio nei confronti dei sieri autoimmuni	23
RISULTATI	

II. 6 Capacità antigeniche della PARPS _{So} a diluizioni crescenti di siero	24
II. 7 Definizione della quantità ottimale di antigene (PARPS _{So})	26
II. 8 Specificità degli anticorpi presenti nei sieri nei confronti dell' antigene non purificato	27
II. 9 Analisi dei sieri mediante immuno dot-blot	29
CONCLUSIONI	30
III CAPITOLO	
ANALISI STATISTICHE	32
MATERIALI E METODI	
III. 1 Raccolta dei sieri	33
III. 2 Analisi dei sieri, a diverse diluizioni, mediante IFI, ELISA e immuno-dot-blot	33
III. 3 Analisi statistica	34
RISULTATI	
III. 4 Analisi della attività anti-PARP, nei sieri di pazienti affetti da LES e nei controlli	35
III. 5 Calcolo del valore soglia dell' attività anti-PARP mediante la curva della Caratteristica Operativa del Ricevitore (curva ROC)	36
III. 6 Attività anti-PARP, classe degli ANA e SLEDAI, in pazienti con il LES Attivo e inattivo	37
III. 7 Correlazione tra attività anti-PARP e SLEDAI-2K e anti-PARP e classe di ANA, in pazienti con LES	38
CONCLUSIONI	42
DISCUSSIONE	44
BIBLIOGRAFIA	47

ABBREVIAZIONI

ADPCF	Frammento catalitico ricombinante della PARP-1
ADPR	Adenosina difosfato ribosio
ANA	Anticorpi Antinucleo
ARA	Associazione Americana per i Reumatismi
BSA	Albumina di siero bovino
DBD	Dominio di legame al DNA
DNA	Acido desossiribonucleico
DNasi I	Desossiribonucleasi I
ds-DNA	Acido desossiribonucleico a doppio filamento
EDTA	Acido etilendiamminotetracetico
EGTA	Acido etilenglicol-bis (β -amminoetiletere) tetracetico
ELISA	Saggio di immunoadsorbimento enzimatico
ENA	Antigeni nucleari estraibili
IFI	Immuno Fluorescenza Indiretta
Ig	Immunoglobuline
LES	Lupus Eritematoso Sistemico
MHC II	Complesso Maggiore di Istocompatibilità
NAD	Nicotinammide Adenina Dinucleotide
NLS	Segnale di localizzazione nucleare
PARP- 1	Poli-ADPRpolimerasi-1
PARPS_{So}	Poli-ADPR polimerasi da <i>S. solfataricus</i>
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
PVDF	Polivinildendifluoruro
RNasi A	Ribonucleasi A
ROC	Caratteristica Operativa del Ricevitore
SDS	Sodio dodecilfosfato
SDS-PAGE	Elettroforesi su gel di poliacrilammide in sodio dodecilsolfato
SEREX	Libreria di cDNA ricombinanti della PARP-1
SLEDAI	Indice di Attività della Malattia
TBS/T	Tampone tris/salino/tween 20

SOMMARIO

Nel presente lavoro di ricerca è stato valutato l' utilizzo clinico di un immunosaggio che sfrutta il termozima purificato poli(adenosina difosfato ribosio) polimerasi da *Sulfolobus solfataricus* (PARPS_{So}) come antigene per la ricerca degli anticorpi anti-PARP nel siero di un gruppo di pazienti affetti da Lupus Eritematoso Sistemico (LES), in diverse fasi cliniche della malattia.

Analisi preliminari hanno riguardato la definizione delle quantità di antigene PARPS_{So} da utilizzare e le condizioni ottimali di immobilizzazione e conservazione della proteina enzimatica su filtro PVDF. Inoltre, è stata valutata la capacità del termozima di reagire con gli anticorpi policlonali commerciali diretti contro il sito catalitico dell' enzima mesofilo PARP-1 e con gli anticorpi anti-PARP presenti nel siero da sangue periferico di soggetti affetti da LES.

Le condizioni del saggio immunochimico definite, sono state utilizzate per la ricerca degli anticorpi anti-PARP nel siero di 44 pazienti affetti da LES, classificati secondo i criteri dell' Associazione Americana per i Reumatismi (ARA) e divisi sulla base dell' attività della malattia, secondo l' Indice di Attività della Malattia del Lupus Eritematoso Sistemico (SLEDAI-2K): 16 con malattia inattiva, con un valore mediano dello SLEDAI-2K = 4 e un IQR=2 e 28 con malattia attiva con un valore mediano dello SLEDAI-2K = 10 e un IQR = 6; inoltre sono stati presi in esame 23 donatori sani. Gli stessi sieri sono stati analizzati con il saggio classico per Immuno Fluorescenza Indiretta (IFI), per la ricerca degli anticorpi antinucleo (ANA).

I livelli ANA nei sieri dei soggetti sani si sono rivelati negativi (ANA⁻), mentre quelli dei pazienti affetti da LES sono risultati positivi (ANA⁺) in tutti i casi (1 caso positivo alla diluizione di 1/40; 12 casi positivi a 1/80; 15 a 1/320; e 1 caso a 1/640 v/v).

I valori di densità degli immunosegnali e i parametri clinici (livelli ANA, SLEDAI-2K), valutati mediante analisi statistiche, hanno rivelato un' attività anti-PARP più alta nei pazienti ANA⁺ (mediana = 181, IQR = 177) che nei controlli (mediana 122,5 IQR 62) con un indice di correlazione $p = 0,005$. Nel gruppo dei sieri LES, lo SLEDAI-2K e l' attività anti-PARP sono risultati significativamente più incrementati nei pazienti con forma attiva della malattia rispetto a quelli con forma inattiva ($p < 0,001$ e $p = 0,001$ rispettivamente). Inoltre, la correlazione tra attività anti-PARP e SLEDAI-2K nei pazienti con il LES è risultata statisticamente significativa ($r = 0,74$; $p < 0,001$), mentre i livelli degli ANA non hanno mostrato correlazione.

Dai risultati ottenuti il termozima PARPS_{So} sembra essere adatto, in un saggio diagnostico di laboratorio, per la ricerca degli anticorpi anti-PARP e potrebbe giocare un

ruolo importante come marcatore sierologico dell' attività della malattia, nei pazienti affetti da LES.

SUMMARY

In the present research the clinical usefulness of an immunotest has been evaluated by using purified Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase from *Sulfolobus solfataricus* as antigen to detect the presence of abnormal anti-poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase antibodies in sera of a cohort of patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE), at different clinical stages.

First the antigen PARPSso concentration the optimal immobilization conditions and the time-dependent denaturation of the enzymatic protein on PVDF membrane were determined. Furthermore, the antigenic ability of the termozyme towards commercial polyclonal antibodies against mesophilic PARP-1 catalytic domain and towards anti-PARP antibodies in sera from patients affected by SLE, was evaluated.

The defined immunoassay conditions, were used to detect anti-PARP antibodies in sera of 44 patients affected by SLE, classified according to American Rheumatism Association criteria (ARA) and divided on the basis of disease activity according to Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)-2K (16 with inactive disease, median SLEDAI-2K = 4 and IQR = 2) and (28 with active disease, median SLEDAI-2K = 10 and IQR = 6) and from 23 healthy donors.

The same sera were analyzed with a classic Indirect Immunofluorescent (IFI) assay for antinuclear antibodies (ANA) detection. ANA detection by IFI revealed that sera of healthy subjects were negative (ANA⁻), whereas those of patients with SLE resulted positive (ANA⁺) in all cases (1 case positive at 1/40 dilution; 12 cases positive at 1/80; 15 cases at 1/320; and 1 case at 1/640 v/v).

The density values of the immunosignal and the clinical parameters (ANA levels, SLEDAI-2K), evaluated by statistical analysis, revealed an anti-PARP activity higher in the ANA positive patients (median = 181, IQR = 62) with a correlation index $p = 0,005$. Within the group of SLE sera, SLEDAI-2K and anti-PARP activity resulted more significantly increased in patients with active than in those with inactive disease ($p < 0,001$ e $p = 0,001$ respectively). In addition, the correlation between anti-PARP activity and SLEDAI in SLE patients was statistically significant ($r = 0,74$; $p < 0,001$), whereas ANA did not correlate.

The PARPSso enzyme seems to be suited to detect anti-PARP antibodies and might play a role as serological marker of disease activity in patients with SLE to set up a new laboratory test.

INTRODUZIONE

Il Lupus Eritematoso Sistemico

Il Lupus Eritematoso Sistemico (LES) è una malattia autoimmunitaria sistemica cronica che colpisce prevalentemente giovani donne in età fertile, con un quadro clinico variabile in cui fasi di latenza si alternano a periodi di estrema aggressività [Hochberg MC., (1997)], [Mok CC. e coll., (2003)].

L'eterogeneità della sintomatologia rende, pertanto, difficile la diagnosi differenziale del LES.

A tal fine, nel 1982 l'Associazione Americana per i Reumatismi (ARA) ha selezionato 11 criteri (su 74 studiati) indispensabili per diagnosticare il LES. Nello studio clinico, una persona si ritiene affetta da LES se presenta 4 o più degli 11 criteri elencati, consecutivamente o contemporaneamente durante un qualsiasi periodo di osservazione [Tan EM. e coll., (1982)] (**Tab. 1**).

- 1. Rash malare:** eritema fisso, piano o rilevato, con aspetto a farfalla
- 2. Rash discoide:** placche eritematose rilevate;
- 3. Fotosensibilità:** rash cutanei da esposizione alla luce solare;
- 4. Ulcere orali:** ulcere al cavo orale e nasofaringeo, osservate dal medico;
- 5. Artrite:** artrite non erosiva che interessa 2 o più articolazioni;
- 6. Sierosite:** pleurite o pericardite;
- 7. Disturbi renali:** proteinuria (> 0.5g/die) persistente oppure cilindri cellulari (eritrociti) granulari, tubulari o misti;
- 8. Disturbi neurologici:** accessi epilettici oppure psicosi, non provocati da farmaci o da alterazioni metaboliche note;
- 9. Alterazioni ematologiche:** anemia emolitica con reticolocitosi, leucopenia (< 4.000/mmc) o linfopenia (< 1500 x mmc) o piastrinopenia (< 100.00 x mmc);
- 10. Disturbi immunologici:** cellule LES o anticorpi anti-DNA nativo o anti Sm o falsa positività dei tests sierologici per la sifilide;
- 11. Anticorpi antinucleo:** dimostrati mediante immunofluorescenza o metodi equivalenti, a titolo anormale, non provocati da farmaci.

Tab. I - Criteri ARA di classificazione del LES [Tan EM. e coll., (1982)]

Inoltre, l'attività della malattia è valutata secondo un quadro clinico di complicazioni correlate ad un indice numerico noto come SLEDAI (Indice di Attività della Malattia) [Bombardier C. e coll., (1992)].

Il LES, è caratterizzato dalla massiccia produzione di autoanticorpi diretti contro numerosi antigeni nucleari, citoplasmatici e di superficie cellulare, con la formazione di

immunocomplessi la cui deposizione tissutale causa infiammazione e danno a diversi organi ed in particolare al tessuto connettivo del rene [Yee CS. e coll., (2003)]. Nel 95% dei pazienti affetti da LES sono presenti autoanticorpi specifici diretti contro antigeni nucleari noti come Anticorpi Antinucleo (ANA) [Tan EM., (1989)].

Questo acronimo identifica immunoglobuline di classe IgG, IgA, IgM non organo-specifiche che possono essere presenti in diverse condizioni patologiche.

Numerosi fattori ormonali [Nazareth M. e coll., (2001)], ambientali e genetici [Hochberg MC., (1997)] [Pisetsky DS., (1997)] sono implicati nel determinismo del complesso fenotipo del LES. Tra i fattori meglio identificati risultano coinvolti alcuni geni codificanti per le componenti della risposta immunitaria associati agli MHC II (Complesso Maggiore di Istocompatibilità) e geni per le proteine del complemento, C2, C4, Fc γ , CR1 e C1q [Mok CC. e coll., (2003)].

Dai risultati ottenuti da Tsao e coll., diversi fattori genetici che contribuiscono alla suscettibilità al LES risultano compresi nella regione del cromosoma umano 1q41-42. Il gene della poli-ADPRpolimerasi-1 (PARP-1) rappresenta uno dei fattori compreso in tale regione. Esso è lungo 43 kb e si esprime attraverso 23 esoni [Tsao BP. e coll., (1999)]. La PARP-1 è il membro più importante di una famiglia di enzimi (PARPs) [Amè JC. e coll., (2004)] che legano unità di ADP-ribosio (in polimeri lineari o ramificati da 2 a oltre 200 residui) a diverse proteine accettrici [Rouleau M. e coll., (2004)]. L'enzima principalmente responsabile del catabolismo del poli-ADPR in vivo è la poli-ADPR glicoidrolasi (PARG) [Fisher AE. e coll. (2007)], che scinde il legame glicosidico tra successive unità di ADPR, nella catena sia lineare che ramificata, fino alla unità prossimale alla proteina accettrice (**Fig. 1**).

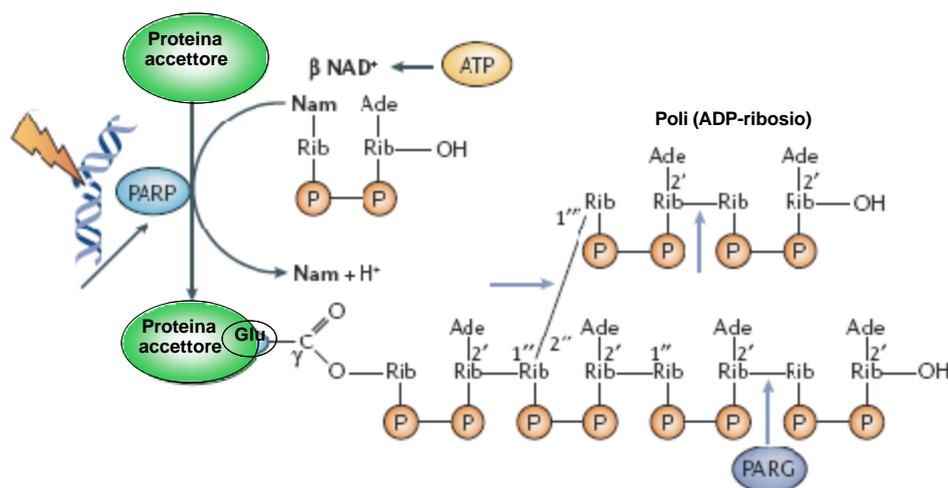


Fig. 1 - La reazione di poli-ADPrilosilazione [de Murcia G. e coll., (2006)].

La PARP-1 è un enzima costituito da una singola catena polipeptidica di 113-120 kDa e possiede un dominio catalitico C-terminale di 54 kDa (aa 525-1014), altamente conservato, che utilizza il coenzima respiratorio β -NAD⁺ come fonte per le unità di adenosina di fosfato ribosio (ADPR). La sua funzione catalitica è stimolata da danni al singolo o doppio filamento di DNA a cui si lega mediante un dominio N-terminale (DBD) di 46 kDa (aa 1-372), costituito da due motivi strutturali a “ dita di zinco” F1 (aa 20-56) e FII (aa 125-162), coinvolto anche nell’ interazione proteina-proteina [*de Murcia G. & Menissier-de Murcia J., (1994)*]. Nello stesso dominio, un segnale di localizzazione nucleare (NLS, aa 202-240) riconosce e lega le Caspasi-3 e -7 coinvolte nella proteolisi della PARP (**Fig. 2**). La proteolisi della PARP mediata dalla caspasi-3 durante l’ apoptosi genera un frammento ammino-terminale di 25 kDa e uno carbossi- terminale di 89 kDa. La separazione fisica dei due domini impedisce l’ attivazione dell’ enzima in presenza di danno al DNA, bloccando la dimerizzazione delle molecole e favorendo il programma apoptotico[*Burkle A., (2001)*]

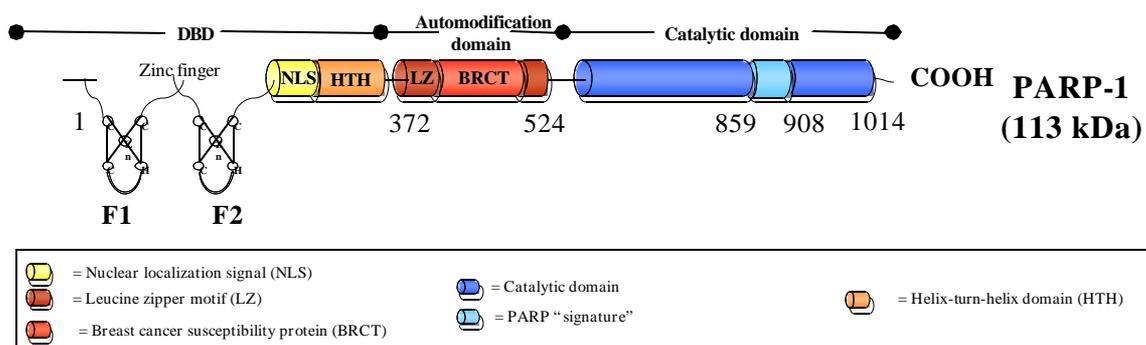


Fig. 2 – Domini funzionali dell’ enzima PARP [*de Murcia G. e coll., (2006)*].

La poli-ADPribosilazione è una modifica post-traduzionale reversibile (**Fig. 1**) coinvolta nella regolazione di diverse funzioni cellulari correlate al mantenimento dell’ integrità genomica (riparazione del DNA, amplificazione genica, apoptosi) e all’ espressione e propagazione dell’ informazione genetica (trascrizione e replicazione del DNA, differenziamento, trasformazione neoplastica) [*Chiarugi A., (2002)*], [*Faraone-Mennella MR. e coll. (2003)*].

Numerosi studi hanno suggerito una stretta relazione tra il sistema di poli-ADPribosilazione e il LES [*Okolie EE. e Shall S., (1979)*], [*Muller S. e coll., (1994)*]. Infatti, la sintesi del poli-ADPribosio (poli-ADPR, PAR) è una risposta immediata al danno al DNA ed è la prima fase in una cascata di eventi che conducono o alla riparazione del DNA o all’ apoptosi [*Caricchio R. & Cohen PL., (1999)*], [*Bijl M. e coll., (2001)*].

L’ osservazione fatta da Okolie e Shall secondo cui gli anticorpi specifici verso il poli-ADPribosio persistono anche quando quelli contro il ds-DNA diminuiscono drasticamente, ha

evidenziato il valore diagnostico degli anticorpi anti-poli-ADPR, i quali potrebbero essere più direttamente correlati al LES e potrebbero rappresentare un marcatore più specifico nella diagnosi precoce e/o nel monitoraggio delle fasi cliniche della malattia.

Questo risultato è avvalorato da una analisi sierologica dell' espressione della libreria di cDNA (SEREX) che ha condotto all' identificazione di autoanticorpi associati al LES diretti contro la poli-ADPR polimerasi (PARP), [Lim Y. e coll., (2002)].

Decker e coll. hanno descritto nel siero dei pazienti LES autoanticorpi diretti contro i motivi a dita di zinco FI e FII dell' enzima PARP, coinvolti nel riconoscimento del DNA danneggiato, il cui ingombro sterico sul sito NLS impedisce la proteolisi dell' enzima mediata dalla caspasi-3. [Decker P. e coll.(2000)].

Nel siero dei pazienti LES è stata riportata la presenza di anticorpi IgG che reagiscono con frammenti della PARP-1 ricombinanti, corrispondenti ai singoli domini strutturali e funzionali dell' enzima **(Fig. 3)**.

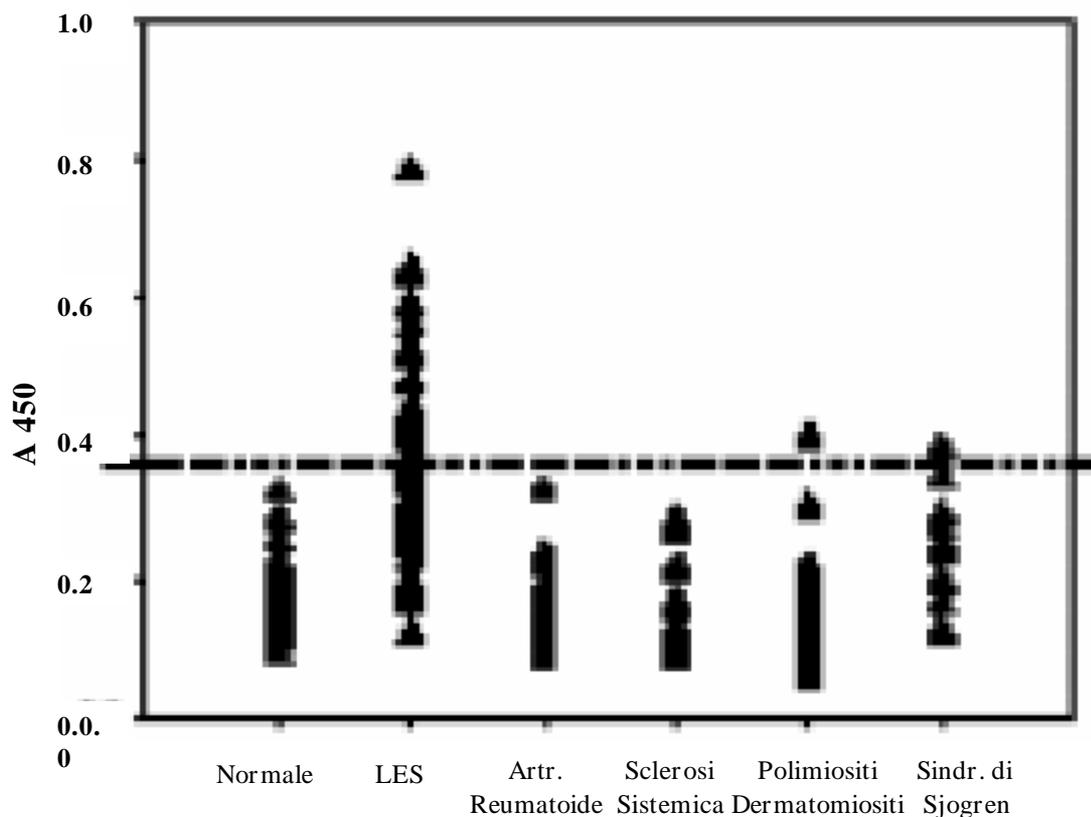


Fig. 3 – Reattività del frammento (ADPCF) ricombinante della PARP con sieri di pazienti affetti da malattie autoimmunitarie in un saggio ELISA [Jeoung D. e coll., (2004)].

Di questi frammenti il più reattivo, si è rivelato quello identificato con la sigla ADPCF (aa 300-1014), corrispondente ai domini catalitico e di automodificazione, che ha mostrato la massima sensibilità e specificità nel riconoscimento di IgG nel siero dei pazienti LES [Jeoung DI. e coll., (2004)].

Attualmente la diagnosi precoce e/o la definizione delle diverse fasi cliniche delle malattie autoimmunitarie, in particolare del LES, sono definite sulla base di una serie di parametri clinici e sierologici. Pertanto, è risultato estremamente importante definire un metodo rapido e sensibile che potesse contribuire alla rivelazione dell'attività della malattia.

Studi condotti da Faraone-Mennella e coll. hanno dato particolare interesse alle proprietà di un termozima (PARPS_{so}) simile alla PARP-1 estratto dall'archeobatterio *S. solfataricus*. L'enzima termofilo e termostabile, purificato all'omogeneità, ha mostrato proprietà simili alla PARP eucariotica, così come l'allungamento della catena di ADP-ribosio per la sintesi di corti oligomeri, la capacità di legare il DNA e di reagire con gli anticorpi policlonali diretti contro l'enzima mesofilo [Faraone-Mennella MR. e coll., (1998)].

Pertanto, la PARPS_{so} ha rappresentato un interessante modello sperimentale per studiare le proprietà antigeniche di questo enzima termostabile, di tipo procariotico, nei confronti di autoanticorpi specifici presenti in sieri di pazienti affetti da malattie autoimmuni, in particolare il LES.

SCOPO, FASI ED ARTICOLAZIONE DELLA RICERCA

Nelle malattie autoimmunitarie, ed in particolare nel Lupus Eritematoso Sistemico, la definizione di marcatori sierologici specifici è fondamentale per una diagnosi differenziale precoce.

Lo scopo di questo lavoro di ricerca è stato quello di stabilire il valore diagnostico e prognostico di una nuova metodica immunochimica, che ha utilizzato il termozima poli-ADPR polimerasi (PARP_{Sso}) estratto dall' archeobatterio *S. solfataricus* come antigene, per la ricerca degli anticorpi anti-PARP nel siero da sangue periferico di soggetti affetti da LES. Pertanto, questa metodica è stata confrontata con quella consolidata per Immuno Fluorescenza Indiretta (IFI), utilizzata comunemente per caratterizzare, nei pazienti, la presenza del LES.

La prima fase del lavoro ha riguardato la scelta del supporto specifico su cui immobilizzare l' antigene sulfobale. La specificità di legame dell' enzima PARP_{Sso} e della PARP-1 eucariotica, nei confronti di anticorpi commerciali policlonali anti PARP-1, è stata inizialmente valutata utilizzando estratti grezzi da *S. solfataricus* e da testicolo di ratto. Inoltre, la stabilità delle due proteine enzimatiche, a diversi tempi di immobilizzazione su filtro (mediante apparecchio Dot-blot), è stata confrontata utilizzando gli enzimi PARP_{Sso} e PARP-1 purificati all' omogeneità. L' analisi densitometrica dei segnali, ottenuti per immunorivelazione degli antigeni immobilizzati su membrana PVDF, è stata utilizzata per standardizzare i tempi di acquisizione dell' immagine.

In una fase successiva della ricerca, sono state analizzate le capacità antigeniche dell' enzima sulfobale nei confronti degli anticorpi anti-PARP presenti nel siero di pazienti affetti da LES, utilizzando diverse diluizioni di questo. La specificità di legame degli anticorpi anti-PARP umani nei confronti del termozima è stata valutata prendendo in esame estratti grezzi di PARP_{Sso}, previa immobilizzazione mediante western-blotting. In seguito, lo stesso tipo di analisi è stata ripetuta con la PARP_{Sso} purificata all' omogeneità e immobilizzata su filtro a differenti concentrazioni, mediante Dot-blot. Sugli antigeni immobilizzati, sono stati analizzati, *in cieco*, un ridotto numero di sieri provenienti da soggetti affetti da LES e da donatori sani.

Una volta standardizzate le condizioni di saggio ottimali (tipo di supporto, quantità di antigene e di siero, tempo di acquisizione dell' immagine) è stato preso in esame, *in cieco*, l' intero gruppo di sieri provenienti da individui affetti da LES e da donatori sani, forniti dal Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale. Il prelievo ematico diviso in due aliquote, è stato utilizzato per la determinazione degli ANA con IFI e degli ENA mediante saggio ELISA, e per la valutazione dell' attività anti-PARP con il metodo immunochimico oggetto

della ricerca. I dati anamnesici e il relativo profilo clinico di ciascun soggetto analizzato sono stati utilizzati per la valutazione dell' indice di attività della malattia (SLEDAI-2K).

Infine, i risultati delle analisi densitometriche ottenuti con il saggio immunochimico da noi utilizzato, unitamente a quelli biochimico-clinici, ai dati anamnesici e ai valori dello SLEDAI-2K, raccolti per ciascun siero preso in esame, sono stati interpretati mediante analisi statistiche appropriate.

I Capitolo

Definizione delle condizioni di analisi della PARP_{Sso} con anticorpi anti-PARP

Il batterio *Sulfolobus solfataricus* è uno tra gli organismi più primitivi nel quale è stato trovato un termozima (PARP_{Sso}) che possiede proprietà simili alla PARP-1 eucariotica [Faraone-Mennella MR. e coll., (2006)].

Le differenze principali dell' enzima archeobatterico sono la termofilicità, la termostabilità e la capacità di sintetizzare corti oligomeri di ADP-ribosio, mentre la PARP eucariotica produce polimeri lunghi e ramificati [Faraone-Mennella MR. e coll., (2000)].

Alcune di queste caratteristiche, hanno reso interessante l' utilizzo dell' enzima archeobatterico (PARP_{Sso}) per un suo possibile impiego diagnostico nel riconoscimento di anticorpi specifici, in pazienti con malattie autoimmuni.

Campioni selezionati di cellule da *S. solfataricus* (ceppo MT 4), sono stati utilizzati per la purificazione dell' enzima ADP-ribosilante (PARP_{Sso}).

Estratti grezzi da *S. solfataricus* e da testicolo di ratto, previa immobilizzazione mediante western-blotting, sono stati analizzati al fine di definire la specificità di legame dell' enzima PARP_{Sso} e della PARP-1 eucariotica nei confronti di anticorpi commerciali policlonali anti-PARP-1 .

Inoltre, la valutazione della stabilità delle due proteine enzimatiche è stata presa in esame a diversi tempi di immobilizzazione su filtro e sono stati utilizzati vari supporti per l' immobilizzazione, mediante dot-blotting, anche degli enzimi PARP_{Sso} e PARP-1 purificati all' omogeneità.

Mediante analisi densitometrica dei segnali, ottenuti per immunorivelazione degli antigeni immobilizzati sul supporto più adatto, è stata valutata la capacità antigenica dell' enzima PARP_{Sso} rispetto alla PARP eucariotica e, infine, sono stati standardizzati i tempi di acquisizione dell' immagine all' apparecchio Chemidoc.

MATERIALI E METODI

I. 1 Crescita del microrganismo e purificazione della proteina PARP_{Sso}

Il ceppo MT4 da *Sulfolobus solfataricus* ha il suo habitat naturale presso la solfatara di Agnano (Na).

L' omogenato grezzo dell' archeobatterio trattato con inibitori delle proteasi (chimostatina, apoproteina, SIGMA, 5 µg/ml), è stato sottoposto a digestione con DNasi I (SIGMA, 2 µg/ml), seguita da una seconda incubazione nelle stesse condizioni, dopo aggiunta di RNasi A. La reazione è stata bloccata con EDTA 0,2 M (concentrazione finale). Dopo centrifugazione a 9800 g, per 15 minuti, il soprannatante (**soprannatante DNasi**) è stato sottoposto alla procedura di purificazione dell' enzima ADPribosilante PARP_{Sso}. [Faraone-Mennella MR. e coll., (1998)].

I. 2 Preparazione dell' estratto nucleare grezzo da testicolo di mammifero

I nuclei sono stati isolati da testicolo di ratto adulto come descritto da [Filipski J. e coll., (1990)] con alcune modifiche. Tutte le fasi sono state condotte a 5 °C; a tutti i tamponi, immediatamente prima dell' uso, sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi 10 µg/mL (Roche). Il tessuto è stato omogeneizzato mediante Dounce in tampone di estrazione TS (Tris-HCl 15 mM pH 7,4, contenente NaCl 10 mM, MgCl₂ 3 mM, NP-40 0,5% e PMSF 0,5 mM, dil. 1:4 ; p/v), e filtrato attraverso tre o quattro strati di garza.

L' omogenato è stato centrifugato a 2000 g per 5 minuti, e il precipitato è stato risospeso in tampone TS con aggiunta di saccarosio 0,12 M (dil. 1:2 p/v) e stratificato su tampone TS contenente saccarosio 0,88 M (1:0,5; v/v). Successivamente, il campione è stato centrifugato a 3000 g per 10 min. I nuclei grezzi ottenuti, sono stati risospesi in tampone TS contenente EGTA 1 mM e saccarosio 0,3 M (dil. 1:2; p/v) e nuovamente centrifugati a 3000 g per 10 minuti.

L'**estratto nucleare** è stato preparato mediante risospensione dei nuclei in Tris-HCl 100 mM, pH 7,2, (contenente KCl 0,5 M, K₂HPO₄ 50 mM, Glicerolo 17% , PMSF 1 mM, β-Mercaptoetanololo 12 mM, Ditiotreitolo 0,5 mM, EDTA 0,5 mM, dil. 1:1 p/v) e incubazione per 30 min, seguita da centrifugazione a 7.500 g per 10 minuti.

I. 3 Analisi elettroforetica delle proteine, western-blot e immunorivelazione con anticorpi anti-PARP

Le proteine del sopranatante DNasi I da *S. solfataricus* (20 µg) e dell' estratto nucleare da ratto (20 µg) sono state separate mediante elettroforesi su mini gel di poliacrilammide al 12% in un sistema Tris-Glicina-SDS, [Nicholas RH. & Goodwin G.H., (1982)] e colorate in *Coomassie Brilliant blue R-250* (0.25%), oppure elettrotrasferite a 4 °C (sistema Bio-Rad) dal gel su membrana di polivinilidene fluoruro (PVDF, GE- Healthcare), a cui è seguita l' immunorivelazione secondo la procedura descritta in [Faraone-Mennella MR. e coll., (1996)], con alcune modifiche.

I filtri PVDF sono stati conservati a 4 °C in tampone TBS (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, contenente NaCl 500 mM).

Per valutare la stabilità degli antigeni, immobilizzati su membrana PVDF, i filtri sono stati immunorivelati a diversi giorni dall' adsorbimento dell' antigene (0, 3, 7, 15, 22, e 50 giorni).

Tutte le fasi per l' immunorivelazione delle proteine sono state condotte a temperatura ambiente. I filtri sono stati incubati per 2h nel tampone TBS contenente albumina di siero bovino (BSA) 1% , per saturare siti aspecifici di legame e, in seguito, lavati con TBST (TBS contenente 0,5% Tween 20).

L' immunorivelazione è stata effettuata con anticorpi policlonali primari da coniglio, diretti contro il sito catalitico della poli(ADP-ribosio) polimerasi 1 umana (PARP-1) (H-250, Santa Cruz Biotechnology), diluiti 1:2000 (v/v) in TBST contenente BSA 1% .

I filtri lavati in TBST, sono stati incubati per 50 min con anticorpi secondari da capra anti-IgG di coniglio coniugati con perossidasi (PIERCE) diluiti 1:4000 (v/v), in TBST con BSA 1% .

Dopo i lavaggi in TBST, l' attività perossidasi è stata rivelata per chemiluminescenza, utilizzando un kit PIERCE (Super Signal® West Dura).

L' acquisizione e l' analisi delle immagini sono state effettuate utilizzando il Chemidoc (Bio-Rad) e il programma Quantity-One (Bio-Rad). Le immagini sono state acquisite ad intervalli di tempo da 3 a 15 secondi.

I. 4 Immobilizzazione dell' antigene su supporti diversi

Quantità diverse di enzima PARP_{So} (0,5 µg – 0,8 µg) purificato all' omogeneità, risospeso in 10 µl ciascuna di tampone TBS, sono state adsorbite mediante apparecchio dot-blot (Bio-Rad Bio-Dot Microfiltration Apparatus) per 1,5 ore, a temperatura ambiente, su diverse membrane, tempo che è risultato essere quello ottimale:

- membrana di polivilidendifluoruro (PVDF), (0,45 μm GE-Healthcare, cod. RPN 303F),
- membrana di polivilidendifluoruro (PVDF), (0,45 μm Schleicher & Schuell);
- membrana di nitrocellulosa (0,45 μm Millipore cod. white HAWP00010);
- membrana di nitrocellulosa (0,20 μm optitran Ba-s cod. 10439396 Schleicher & Schuell).

L' efficienza del legame dell' antigene al supporto è stata rivelata mediante colorazione della membrana con rosso Ponceau, dopo tre rapidi lavaggi, eseguiti mediante applicazione del vuoto, in TBST che hanno allontanato l' eccesso di antigene non legato.

I. 5 Immunorivelazione di proteine immobilizzate mediante dot-blot

La PARPS_{so} purificata da *S. solfataricus* e la PARP eucariotica precedentemente purificata da testicolo di ratto, risospese in TBS sono state adsorbite per 1,5 ore a temperatura ambiente, in duplicato, nelle quantità stabilite per la prova (0,25, 0,5, 0,8, 1,0 μg), su membrana PVDF (GE-Healthcare), mediante apparecchio dot-blot (Bio-Dot microfiltration Apparatus, Bio-Rad).

Come controllo negativo, sono state analizzate, nelle stesse quantità degli antigeni PARPs, albumina di siero bovino, (BSA, Sigma) e desossiribonucleasi I da pancreas bovino (DNasi I Sigma), risospese in tampone TBS a pH 7,5. Questo valore di pH è risultato ottimale per la formazione del complesso antigene- anticorpo, come riportato in letteratura [*Faraone-Mennella MR. e coll., (1996)*].

L' immunorivelazione e i lavaggi del filtro sono stati condotti, mediante apparecchio dot-blot, seguendo la procedura descritta nel paragrafo I.3. Le immagini sono state acquisite ad intervalli di tempo di 0,5 sec, 1 sec, 1,2 sec.

Per valutare le condizioni ottimali di stabilità della PARPS_{so}, quantità fisse di enzima purificato, BSA e DNasi I (0,8 μg), in duplicato, sono state adsorbite mediante dot-blot, su filtri di PVDF come descritto in precedenza.

I filtri sono stati analizzati in diverse condizioni:

- immediatamente dopo l' adsorbimento (t = 0 ore).
- dopo 60 ore, conservando i filtri a 4 °C in TBS oppure in TBST, dopo la fase di blocco dei siti aspecifici.

Dopo opportuno blocco dei siti aspecifici, per i filtri lasciati in TBS, è stata eseguita l' immunorivelazione e l' analisi densitometrica delle immagini come descritto in precedenza.

RISULTATI

I. 6 Specificità e stabilità antigenica dell' enzima PARP eucariotico e della PARP_{So}

Per l' analisi della specificità di legame, è stato utilizzato il soprantante DNasi I da *S. solfataricus* (20 µg) e l'estratto nucleare da ratto (20 µg). In Fig. 4A sono riportati i risultati dell' analisi elettroforetica dei campioni e degli stessi sottoposti ad immunorivelazione con anticorpi commerciali anti-PARP 1, diretti contro il sito catalitico.

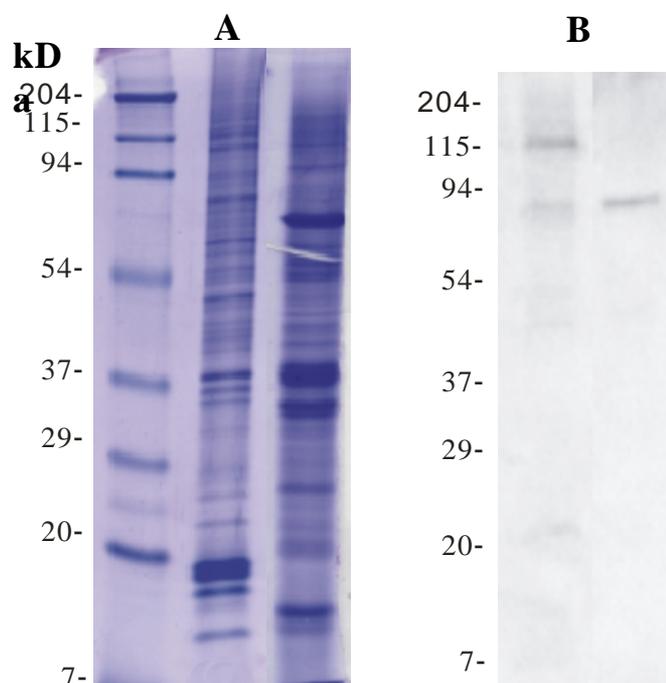


Fig. 4 – Elettroforesi e analisi mediante western-blot dell' estratto nucleare da testicolo di ratto e del soprantante DNasi I di *Sulfolobus solfataricus*.

A) SDS-PAGE (12%): (DM) Dalton Markers, (N) estratto nucleare di testicolo di ratto, (S) soprantante DNasi di *S. solfataricus*;

B) corrispondente immunoblotting con anticorpi policlonali anti-PARP.

L' immunoblot ha rivelato, nel soprantante DNasi di *S. solfataricus*, la presenza di una banda a 90 kDa, corrispondente ad una forma aggregata di due molecole di PARP_{So} (46,5 kDa). È interessante osservare per *S. solfataricus* la specificità dell' immunoreazione, che rivela una singola banda colorata, nonostante l' eterogeneità di proteine presenti nel campione analizzato.

Per l' estratto nucleare da testicolo di ratto è stata evidenziata la presenza di un segnale più intenso a 116 kDa, corrispondente alla PARP-1, e una banda più debole a 89 kDa corrispondente al frammento apoptotico dell' enzima stesso (**Fig. 4B**).

Per valutare la stabilità degli stessi antigeni, questi sono stati analizzati, sempre nelle stesse condizioni, a diversi giorni dall' immobilizzazione su membrana PVDF (0, 3, 7, 15, 22,

50 giorni) e per tempi crescenti di acquisizione del segnale. I valori di densità ottica, per i campioni, sono risultati incrementati in misura proporzionale al tempo di esposizione. In particolare, l'intensità dell'immunosegnale per il campione eucariotico, è apparsa raddoppiata rispetto al campione procariotico, a tutti i tempi di esposizione (**Fig. 5**).

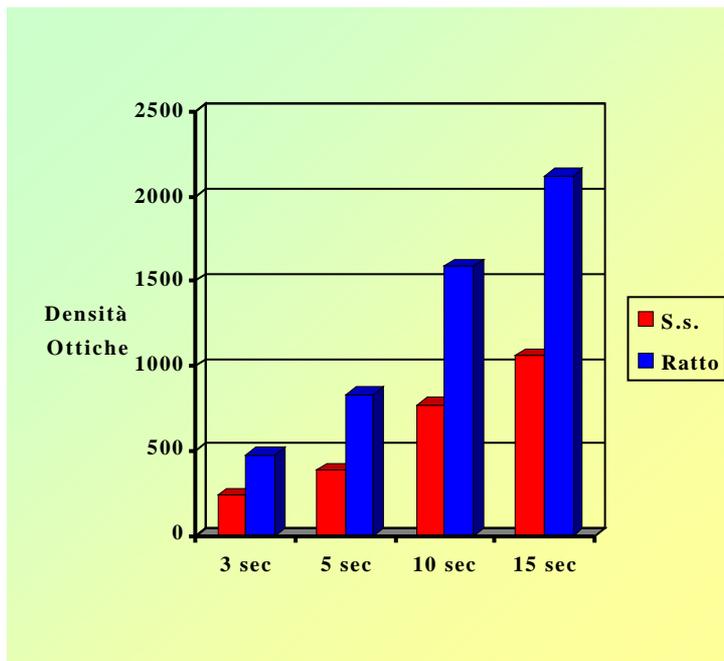


Fig. 5 - Densità ottiche dei campioni da *S. solfataricus* e da ratto, dopo 3 giorni di immobilizzazione su PVDF, a diversi tempi di esposizione, in presenza di anticorpi anti-PARP commerciali.

Da un'ulteriore analisi dei segnali di chemiluminescenza dell'antigene procariotico, le densità ottiche rilevate per gli stessi tempi di acquisizione (3, 5, 10 e 15 secondi), a diversi giorni dall'immobilizzazione, hanno mostrato valori paragonabili. Infatti, come riportato nella **Tab. II**, le deviazioni standard, per l'antigene sulfobale, calcolate sulla media delle densità ottiche, relative a ciascun tempo di acquisizione, a diversi giorni di immobilizzazione, assumono valori non significativi.

L'antigene eucariotico, a differenza di quello procariotico, a diversi giorni di immobilizzazione, per gli stessi tempi di acquisizione ha mostrato un andamento delle densità ottiche non costante e scarsamente significativo, come evidenziato dai valori elevati delle relative deviazioni standard (**Tab. II**).

Tempo (sec.)	PARPS_{so} Media O.D.± Deviazione Standard	PARP Media O.D.± Deviazione Standard
3	104,83±18,8	433±323,5
5	160± 10,1	784,8±527,8
10	295,3±27,5	1405,17±827,8
15	375,2±35,5	1798,3±1138,9

Tab II - Media delle densità ottiche, per vari tempi di acquisizione dell' immagine a diversi giorni di immobilizzazione degli antigeni grezzi PARP e PARPS_{so}, con le relative deviazioni standard.

Questo risultato può essere spiegato considerando che i valori di densità ottica a tempi maggiori di acquisizione, sono così elevati da non poter dare una corretta proporzionalità (valori di densità pressoché 4 volte superiori a quelli misurati per *S. solfataricus*).

I. 7 Scelta del supporto di immobilizzazione dell' antigene

Il confronto dei risultati colorimetrici, ottenuti per lo stesso campione analizzato sulle diverse membrane, ha evidenziato che alle concentrazioni di antigene prese in esame (0,5- 0,8 µg) (Materiali e Metodi, paragrafo 4), tutte hanno mostrato una soddisfacente affinità di legame per la PARPS_{so}, tranne la Nitrocellulosa Millipore (0,45µm) sulla quale il segnale è risultato molto debole (dati non mostrati).

A parità di quantità di antigene (PARPS_{so}) immobilizzato, la membrana che ha mostrato migliore affinità di legame e minore colorazione del fondo del supporto, si è rivelata essere la PVDF (GE-Healthcare) che, pertanto, è stata scelta per tutti gli esperimenti successivi.

Inoltre, la PARPS_{so} nella quantità di 0,8 µg ha dato una maggiore e ottimale intensità di colorazione, utilizzando un tempo di adsorbimento di 1,5 ore (dati non mostrati) .

I. 8 Capacità antigeniche della PARPS_{so} nei confronti di anticorpi commerciali

Dall' analisi delle immagini acquisite a tempi diversi mediante chemiluminescenza, utilizzando il programma Quantity One e le condizioni di reazione indicate in Materiali e Metodi parag. 5, è emersa una cross-reattività della PARPS_{so}, con gli anticorpi anti-PARP pressochè paragonabile a quella ottenuta in presenza di PARP eucariotica (**Fig. 6 a**), in accordo con precedenti dati [Faraone-Mennella MR. e coll., (1998)]. Sulla base dei risultati ottenuti, la quantità di PARPS_{so} (0,8 µg) si è rivelata ottimale per l' analisi dell' immunosegnale. I valori di densità riportati, per i diversi campioni esaminati e per i controlli negativi (BSA e DNasi I) sono la media di quattro determinazioni differenti. Pertanto, nelle successive analisi, i risultati ottenuti per la PARPS_{so} sono stati sempre sottratti del valore del controllo negativo più alto (BSA), al fine di apprezzarne meglio la significatività (**Fig. 6 b**).

La stessa esperienza è stata utilizzata per standardizzare l' intervallo dei tempi di acquisizione delle immagini al Chemi-doc.

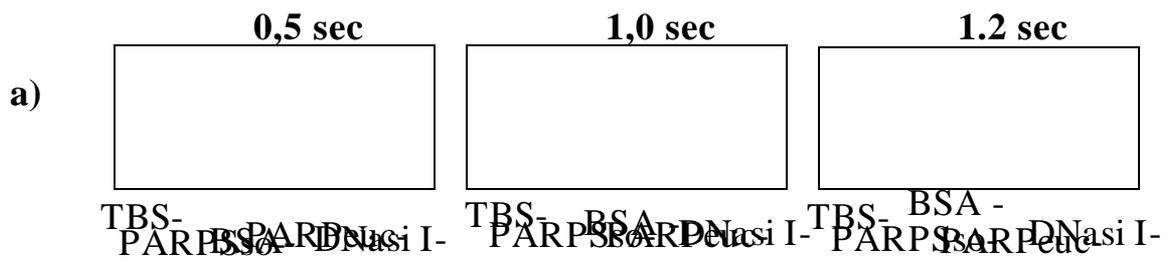
Questa analisi si è resa necessaria, avendo osservato che con gli antigeni purificati e immobilizzati mediante dot-blot i valori delle densità ottenuti nell' intervallo di tempo da 3 a 15 sec (parag. I.6) non aumentavano in misura proporzionale. Pertanto, l' acquisizione delle immagini è stata condotta per tempi (0,5 sec- 1,0 sec- 1,2 sec) a cui il segnale ha rivelato una intensità di immagine ottimale e correttamente determinabile.

Dal confronto dei rapporti di densità tra antigene eucariotico PARP, PARPS_{so} e controlli negativi (DNasi I e BSA), misurati a vari tempi di acquisizione, il valore in corrispondenza del quale i risultati hanno presentato maggiore significatività e proporzionalità è risultato essere ad 1 sec di esposizione (**Fig. 6 c**).

Dopo adsorbimento di pari quantità di PARPS_{so}, BSA e DNasi I (0,8 µg), i filtri di PVDF, conservati in TBS e in TBST, dopo aver bloccato i siti aspecifici (parag. I. 5), sono stati immunorivelati mediante l' uso di anticorpi anti-PARP commerciali a 60 ore dall' immobilizzazione dell' antigene.

Dall' analisi diretta del segnale di chemiluminescenza a un tempo di acquisizione dell' immagine di 1 sec., non sono emerse sostanziali differenze quantitative tra l' antigene immunorivelato immediatamente dopo l' immobilizzazione (t = 0 ore) e quello conservato per 60 ore in diverse condizioni (**Fig. 7 A**).

I valori di densità sono apparsi, in ogni caso, pressochè paragonabili e non è risultata aumentata la risposta aspecifica a tempi lunghi di immobilizzazione dell' antigene, come si è osservato dal confronto con i rispettivi controlli negativi, rappresentati dalla BSA, dal TBS, e dalla DNasi I (**Fig. 7 B**). Pertanto, è stata confermata la termostabilità dell' antigene PARP_{So} purificato (una volta immobilizzato su membrana) e la sua capacità di conservare inalterata, in diverse condizioni, la cross-reattività con gli anticorpi policlonali anti-PARP.



Densità

b)

	0,5 sec	1,0 sec	1,2 sec
PARP	543	1519	2612
PARPSso	475	1583	2568
BSA	213	436	874
DNasi I	151	233	464
TBS	84	105	211

Rapporti densitometrici

c)

	0,5sec	1,0sec	1,2sec
PARP/BSA	2,5	3,5	3,0
PARP/DNasi I	3,6	6,5	5,6
PARPSso/BSA	2,2	3,6	2,9
PARPSso/DNa	3,1	6,8	5,5

si I

Fig. 6 - Capacità antigeniche della PARPSso

- a) Immunoblots rivelati a tempi diversi
- b) Valori densitometrici per i diversi antigeni e controlli
- c) Rapporti di densità antigene/controllo negativo

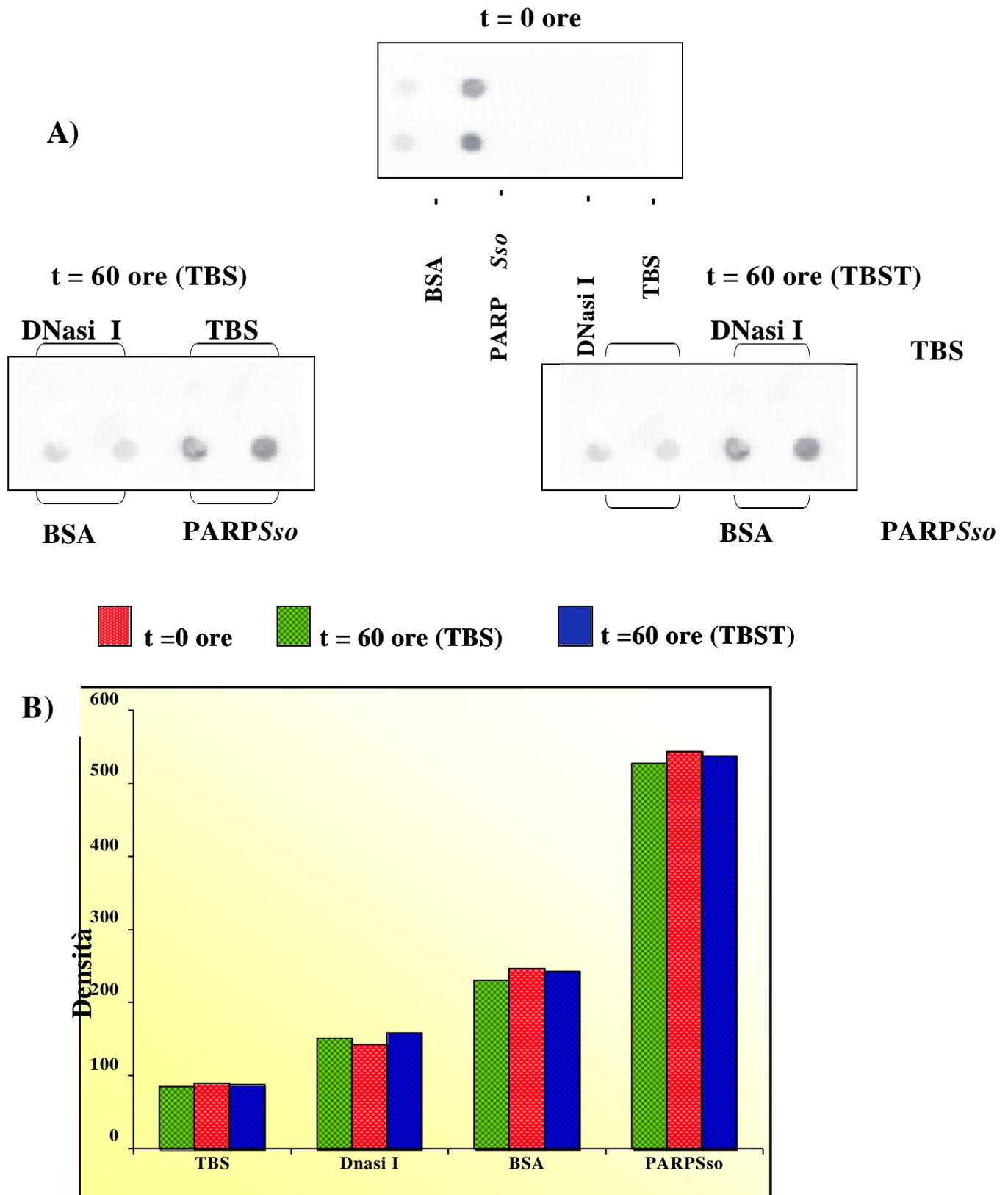


Fig. 7 – Stabilità dell' enzima PARPSso in diverse condizioni e a diversi tempi di conservazione del filtro.

A) Immunoblotting dei filtri

B) Valori densitometrici delle relative immunorivelazioni

CONCLUSIONI

L'analisi del soprannatante DNasi I da *S. solfataricus* con anticorpi policlonali anti-PARP ha confermato una elevata specificità di legame per l'antigene PARPS_{so}, anche in forma di dimero (90 kDa) [Faraone-Mennella MR. e coll., (2000)].

L'intensità dell'immunosegnale ottenuto a parità di proteine caricate (20g), per lo stesso tempo di immobilizzazione, utilizzando preparati grezzi degli enzimi PARPS_{so} e PARP eucariotica, ha mostrato un incremento proporzionale per tempi crescenti di acquisizione dell'immagine (Fig. 5).

Le densità ottiche misurate per il campione eucariotico sono apparse raddoppiate rispetto al campione procariotico. L'antigene eucariotico, per tempi prolungati di immobilizzazione, ha mostrato un andamento delle densità ottiche non costante con valori così elevati ai quali non si ha proporzionalità (valori di densità 4 volte superiori a quelli misurati per *S. solfataricus*, Tab. II).

Gli enzimi purificati PARPS_{so} e PARP, immobilizzati in diverse quantità mediante dot-blot, hanno evidenziato una immunoreattività paragonabile. In particolare, una quantità di antigene di 0,8 µg si è rivelata ottimale per la valutazione dell'immunosegnale, in corrispondenza di un tempo di esposizione dell'immagine di 1,0 sec., e significativa rispetto ai controlli negativi (BSA e DNasi I) come è emerso dal confronto dei rapporti di densità (Fig. 6).

Inoltre, la stabilità del termozima PARPS_{so} indica la possibilità di un suo impiego per tempi lunghi, dopo l'immobilizzazione sul filtro, senza che esso perda le sue capacità antigeniche, sia prima che dopo la fase di blocco dei siti aspecifici (Fig. 7).

Pertanto, è stata confermata la termostabilità dell'enzima PARPS_{so} e la sua capacità di conservare inalterata, per tempi piuttosto lunghi, la cross-reattività con gli anticorpi policlonali anti-PARP. A seguito di tali risultati, nelle successive analisi è stato utilizzato come antigene il termozima PARPS_{so} e le relative densità sono state sempre sottratte del valore del controllo negativo più alto, al fine di apprezzarne meglio la significatività.

II CAPITOLO

Capacità antigeniche della PARP_{So} con sieri di pazienti affetti da malattie autoimmuni

Le malattie autoimmunitarie sono patologie caratterizzate da una massiccia produzione di anticorpi specifici diretti verso numerosi antigeni nucleari, (ANA e ENA), citoplasmatici e di superficie cellulare.

Gli anticorpi antinucleo (ANA) sono immunoglobuline rivolte contro antigeni contenuti nei nuclei cellulari, si distinguono in anticorpi diretti contro il DNA nativo a doppio filamento (ds-DNA), anticorpi diretti contro gli istoni o il complesso DNA/istone (anticorpi antinucleoproteina) e anticorpi diretti contro antigeni nucleari estraibili non contenenti DNA (anti-ENA) rappresentati da ribonucleoproteine (U1RNP, Sm, Ro/SS-A, La/SSB) o proteine ribosomiali e infine contro la cardiolipina. Si tratta di autoanticorpi non organo-specifici che possono essere presenti in diverse condizioni patologiche e che, nelle malattie reumatiche sistemiche o connettiviti, come il Lupus Eritematoso Sistemico, raggiungono la frequenza ed i livelli più elevati. Tuttavia, gli anticorpi anti-Sm e quelli diretti contro il DNA a doppio filamento (anti ds-DNA) sono specifici nelle glomerulonefriti indotte dal LES; infatti, la loro presenza è inclusa nella classificazione dei criteri ARA.

Gli ANA, pur avendo un' accettabile sensibilità diagnostica nell' identificazione delle patologie autoimmuni, mostrano una specificità ancora insoddisfacente che ne impedisce la diagnosi differenziata. Tali considerazioni giustificano la ricerca di nuovi marcatori diagnostici caratterizzati da una ottimale sensibilità e soprattutto da una elevata specificità.

Pertanto, è apparso interessante l' impiego del termozima PARP_{So} purificato dall' archeobatterio *S. solfataricus* come molecola bioattiva per analizzarne le capacità antigeniche nei confronti di autoanticorpi presenti nel siero di soggetti autoimmuni.

Sulla base delle esperienze e delle conoscenze maturate con l' uso di anticorpi commerciali anti-PARP, descritte nel Cap. I, le capacità antigeniche della PARP_{So} nei confronti di anticorpi presenti nel siero da sangue periferico umano, sono state analizzate utilizzando un gruppo di 18 sieri forniti, *in cieco*, dal Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell' Università di Napoli "Federico II" e identificati con le sigle numeriche (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18).

La ricerca degli autoanticorpi anti-PARP è stata condotta esaminando inizialmente un gruppo di 7 sieri (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07), come tali e a diluizioni progressivamente crescenti degli stessi, utilizzando l' antigene PARP_{So} purificato all' omogeneità e immobilizzato su filtro di PVDF, mediante Dot-blot.

Sulla base dei primi risultati ottenuti, i sieri (05, 06 e 07) insieme ad altri 5 campioni (08, 09, 10, 11 e 12) sono stati scelti per definire la riproducibilità e la sensibilità del metodo. L'analisi è stata eseguita riducendo la concentrazione dell' anticorpo secondario anti-human, e utilizzando quantità scarsi di antigene PARP_{So}.

Inoltre, la capacità degli autoanticorpi anti-PARP, presenti nei sieri analizzati, di riconoscere specificamente l' antigene, è stata ulteriormente confermata utilizzando anche il sopranatante DNasi I da *S. sulfataricus* e l' estratto nucleare grezzo da testicolo di ratto, previa immobilizzazione delle proteine presenti in questi due campioni mediante western-blotting. A tale scopo, i sieri (01 e 04) precedentemente analizzati per la presenza di anticorpi anti-PARP con l' antigene purificato e un nuovo gruppo di 6 sieri sono stati selezionati ed analizzati anche con l' antigene presente in campioni grezzi.

Infine, l' attendibilità del test, è stata valutata analizzando, *in cieco*, l' intero gruppo di sieri da 01 a 18 e utilizzando come controllo negativo la BSA. I valori di densità ottenuti sono stati analizzati mediante il confronto con il profilo biochimico-clinico di ciascun soggetto di appartenenza del siero.

Le condizioni ormai standardizzate di saggio sono state utilizzate, in seguito, per l' analisi di tutti i successivi sieri inviati dal Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale.

MATERIALI E METODI

II. 1 Raccolta dei campioni di siero

I sieri presi in esame sono stati forniti dal Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli “Federico II” configurato come “Centro di Eccellenza” per le patologie reumatiche dell’età adulta e pediatrica della Campania.

I campioni di sangue periferico sono stati prelevati da soggetti sani (Controlli) e da pazienti affetti da diverse tipologie della sindrome autoimmune (Autoimmuni).

Il prelievo ematico, oltre ad essere utilizzato per l’ esecuzione del profilo biochimico clinico generale, è servito per la determinazione dei livelli di autoanticorpi circolanti.

In particolare, il siero è stato diviso in due aliquote, una delle quali è stata destinata, presso lo stesso Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, alla determinazione degli ANA con la procedura classica di analisi per Immuno Fluorescenza Indiretta (IFI) [*Molden DP. e coll., (1984)*], la quale utilizza cellule epiteliali HEp-2 come substrato. Gli anticorpi anti-dsDNA sono stati determinati mediante la procedura che utilizza *Crithidia luciliae* come substrato [*Smeenk R.. & Hylkema M., (1992)*]. La presenza degli anticorpi anti-ENA (Sm, RNP, le frazioni SSA e SSB) è stata testata utilizzando la tecnica ELISA [*Maddison PJ. e coll. (1985)*].

L’ altra aliquota, conservata a -80 °C, è stata consegnata alla nostra Unità di Ricerca per l’ analisi immunochimica degli anticorpi anti-PARP.

Per garantire l’ analisi *in cieco* dei sieri (identificati con una sigla numerica), non sono state fornite ulteriori informazioni riguardanti l’ anamnesi dei donatori.

II. 2 Immobilizzazione della PARPSSo e analisi dei sieri, a diverse diluizioni, mediante dot-blot

Pari quantità (0,8µg) di enzima PARPSSo purificato e BSA sono state immobilizzate, in duplice copia, su membrana PVDF (GE-Healthcare), sottoposta a blocco dei siti aspecifici e ai successivi opportuni lavaggi mediante Dot-blot, come descritto nel parag. I. 5. Tutte le fasi sono state condotte a temperatura ambiente.

Successivamente, 7 sieri scelti a caso (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07) sono stati incubati come tali (10 µL) e alle diluizioni di ciascuno di essi corrispondenti a 1/1; 1/50; 1/100; 1/200; 1/500; (v/v in TBS), lasciati adsorbire per 1,5 h a temperatura ambiente.

La membrana sottoposta a tre rapidi lavaggi in TBST (mediante applicazione del vuoto), è stata poi incubata per 50 min con anticorpi secondari anti-Human IgG (Goat) [HRP-Labeled Nef 802 NEN[®]] coniugati con perossidasi, diluiti 1/4000 (v/v in TBST/BSA 1%).

Lo stesso esperimento è stato ripetuto con una maggiore diluizione dei sieri 1/1000 (v/v in TBS), e una diluizione 1/10.000 (v/v in TBST/BSA 1%) dell' anticorpo secondario anti-Human, come consigliato dalla casa produttrice NEN[®].

Dopo una serie di lavaggi rapidi, l' attività perossidasi è stata rivelata per chemiluminescenza, utilizzando un kit PIERCE (Super Signal[®] West Dura).

L' acquisizione delle immagini è stata effettuata utilizzando il ChemiDoc (Bio- Rad). Le immagini sono state acquisite dopo un tempo di esposizione di 1 secondo e l' analisi densitometrica è stata eseguita con il programma Quantity One (Bio-Rad).

II. 3 Determinazione di autoanticorpi presenti nei sieri, a concentrazioni differenti di antigene

Quantità scalari di PARP_{So} purificata e di BSA in duplicato (0,4 µg, 0,8µg), immobilizzate su filtri di PVDF mediante tecnica Dot-blotting, previamente sottoposte a blocco dei siti aspecifici con tampone TBS/BSA 1%, sono state incubate con i sieri, identificati con i numeri 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12 (come descritto nel parag. II. 2. Nell' intervallo di diluizioni dei sieri compreso tra 1/500 e 1/1000 (v/v), è stato aggiunto un punto intermedio a 1/700 (v/v).

Dopo opportuni lavaggi e incubazione per 50 min con anticorpo secondario diluito 1/10.000 (v/v in TBS/BSA.1%), i filtri sono stati rivelati e analizzati come descritto nel parag. II. 2.

II. 4 Specificità di legame degli autoanticorpi presenti nei sieri, in presenza di antigene non purificato.

Nei filtri di PVDF sono stati adsorbiti pari quantità (20 µg) di estratto nucleare grezzo di testicolo di ratto e di sopranatante DNasi I di *S. solfataricus*. Le proteine dei due campioni sono state separate su SDS-PAGE 12% e immobilizzate mediante western-blotting, a cui è seguito il blocco dei siti aspecifici come descritto nel parag. I.3.

Successivamente, ciascun filtro è stato incubato, a temperatura ambiente, con ognuno dei sieri scelti per la prova (01, 04, 13, 14, 15, 16, 17 e 18), diluiti 1/500 (in TBS v/v) a cui è seguita una incubazione per 1,5 h.

La membrana sottoposta a tre lavaggi in TBST è stata poi incubata con anticorpi secondari anti-human e immunorivelata seguendo le condizioni descritte al parag. II. 2.

II. 5 Attendibilità del saggio nei confronti dei sieri autoimmuni

Per valutare la capacità del saggio nel riconoscere i sieri autoimmuni dai controlli, pari quantità (0,4 µg) di PARPSso e BSA in duplice copia sono state adsorbite su filtri PVDF mediante dot-blot. I filtri sono stati incubati per 1,5 ore con i sieri (n. 01, 04, 05, 06) diluiti 1:500 (v/v in TBS).

Dopo tre rapidi lavaggi in TBST, sono stati trattati per 50 minuti a temperatura ambiente con anticorpi secondari anti-human IgG (goat) [HRP-Labeled Nef 802 NEN®] coniugati con perossidasi diluiti 1/10000 (v/v in TBST/BSA1%) e successivamente lavati per tre volte in TBST. L' immunorivelazione è stata eseguita secondo il metodo descritto nel parag. II 2.

RISULTATI

II. 6 Capacità antigeniche della PARP_{SSo} a diluizioni crescenti di siero

Le esperienze e le conoscenze maturate con l' uso di anticorpi commerciali antiPARP (Cap. I), hanno consentito la scelta iniziale delle quantità di PARP_{SSo} e di BSA (0,8 µg) da immobilizzare e del tempo più idoneo di esposizione del filtro (1 sec), per l' acquisizione e l' analisi delle immagini.

Al fine di valutare la capacità antigenica dell' enzima PARP_{SSo} purificato (0,8µg) nei confronti di autoanticorpi presenti nel siero umano, nella fase preliminare delle indagini sono stati selezionati 7 sieri, identificati con le sigle numeriche: 01, 02, 03, 04, 05, 06,07.

La ricerca degli autoanticorpi anti-PARP è stata condotta su sieri come tali e dopo diluizioni progressivamente crescenti degli stessi in TBS (v/v), rivelati poi con anticorpo secondario anti-human diluito 1/4000 (v/v in TBST/1% BSA), come descritto nel parag. II. 2.

L' intensità del segnale dei singoli sieri, alle diluizioni utilizzate (fino a 1/200 v/v in TBS), sottratta del valore del corrispondente controllo negativo (BSA), si è rivelata piuttosto variabile tra i campioni presi in esame, ed i corrispondenti valori densitometrici non hanno mostrato proporzionalità con le corrispondenti diluizioni (dati non mostrati).

Per contro, a diluizioni uguali o superiori a 1/200 (v/v) e ad un tempo di acquisizione dell' immagine di 1 sec la densità misurata, in quasi tutti i campioni esaminati, ha mostrato valori proporzionali alla quantità di siero aggiunto.

Analizzando il grafico in **Fig. 8**, per ciascun siero sono stati osservati valori di densità che diminuiscono all' aumentare della diluizione.

In corrispondenza dei sieri (05, 06 e 07) si è osservato un segnale più debole che, alle diluizioni utilizzate, ha mostrato differenze poco apprezzabili nei rispettivi valori densitometrici con un progressivo appiattimento dei valori, alla diluizione di 1/500 (v/v).

Le densità corrispondenti ai sieri (01, 02, 03 e 04) diluiti 1/500 (v/v) si sono rivelate ridotte approssimativamente del 50% .

Pertanto, alla diluizione dei sieri di 1/500 (v/v) il confronto dei valori di densità per ciascun siero ha mostrato una ridotta variabilità di risposta.

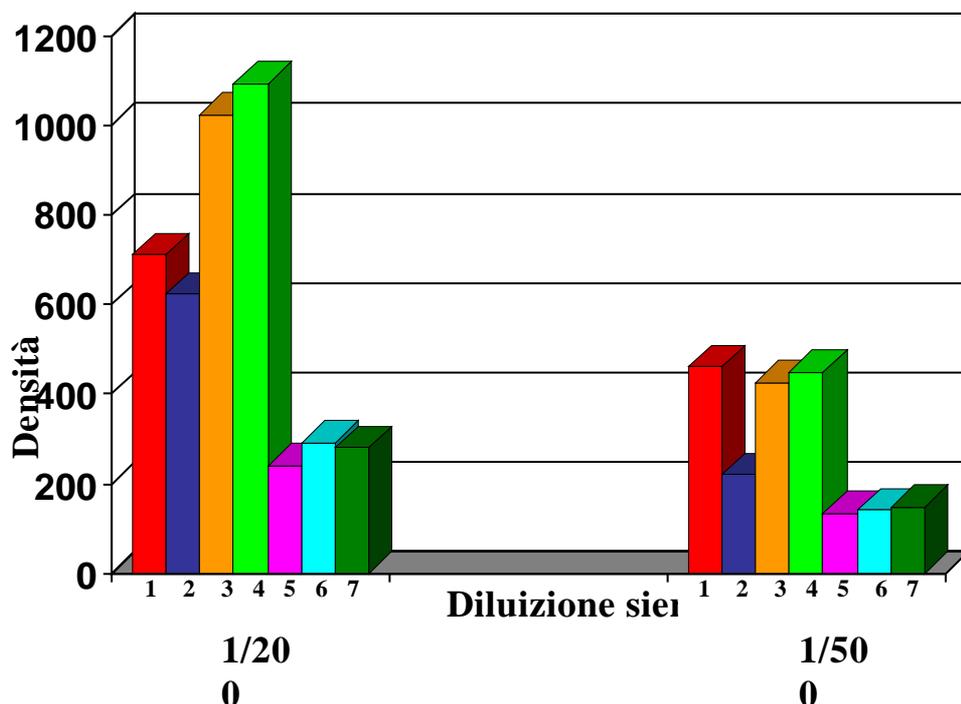


Fig. 8 – Valori di densità alle diluizioni indicate dei sieri e dell' Ab 2° 1/4000 v/v.

In una successiva analisi, in presenza di una concentrazione dell' anticorpo secondario anti-human, 1/10000 (v/v in TBST/BSA 1%) e con una ulteriore diluizione dei sieri a 1/1000 (v/v) (in TBS), i valori di densità hanno mostrato differenze più significative pur conservando un profilo simile a quello ottenuto nell' esperienza precedente, con una riduzione in generale dell' intensità del segnale all' aumentare della diluizione del siero (Fig 9).

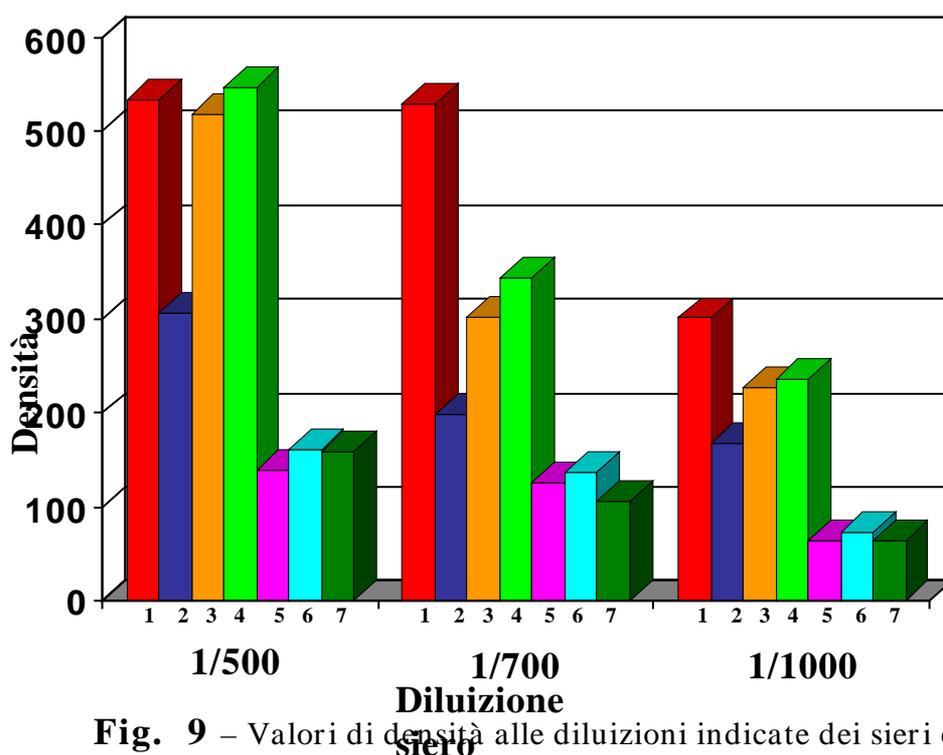


Fig. 9 – Valori di densità alle diluizioni indicate dei sieri e dell' Ab 2° 1/10000 v/v.

I sieri (05, 06 e 07) per diluizioni superiori a 1/500 (v/v), tendono ad assumere valori molto bassi. Nei restanti sieri (01, 02, 03 e 04), l' aumento della diluizione rende più evidenti e marcate alcune differenze tra i valori densitometrici.

I risultati riportati hanno permesso di stabilire che l' intervallo di diluizioni dei sieri compreso tra 1/500 e 1/1000, in presenza dell' anticorpo secondario diluito 1/10000 (v/v), sembra essere quello più significativo e rappresentativo per poter apprezzare meglio le differenze nel contenuto di autoanticorpi presenti nei sieri esaminati.

II. 7 Definizione della quantità ottimale di antigene (PARPS_{so})

Una volta definiti i valori ottimali di diluizione del siero (1/500-1/1000 v/v) e dell' anticorpo secondario (1/10.000 v/v), è stata presa in esame la quantità di antigene con la quale si potesse ottenere un significativo ed attendibile segnale anche in presenza di un ridotto contenuto di anticorpi anti-PARP. A tal fine, sono stati scelti i sieri 05, 06 e 07 che nell' analisi precedente avevano mostrato i più bassi valori di densità ed un nuovo gruppo di 5 campioni (08, 09, 10, 11 e 12) mai utilizzati. I sieri sono stati analizzati a tre differenti diluizioni (1/500, 1/700, 1/1000 v/v).

Il valore di densità ottenuto per i singoli sieri alle diverse diluizioni, in presenza di 0,8 µg di PARPS_{so} purificato, si è rivelato significativo ma con differenze poco apprezzabili per diluizioni superiori a 1/500.

Utilizzando 0,4 µg di PARPS_{so} purificato, la variabilità dei valori di densità, ottenuti per ciascun siero alle diverse diluizioni, è risultata più rilevante, anche per i sieri i cui risultati, in precedenza, non era ben definiti. In particolare, la variazione più significativa dei valori densitometrici è risultata corrispondere ad una diluizione del siero di 1/500 (v/v) alla quale la differenza nel contenuto di autoanticorpi anti-PARP nei singoli sieri è resa più evidente e marcata (**Fig. 10**).

Pertanto la diluizione del siero 1/500 (v/v), con un anticorpo secondario diluito 1/10000 (v/v), in presenza di 0,4 µg di PARPS_{so} purificato, è stata considerata la condizione ottimale per eseguire le analisi successive di tutti i sieri.

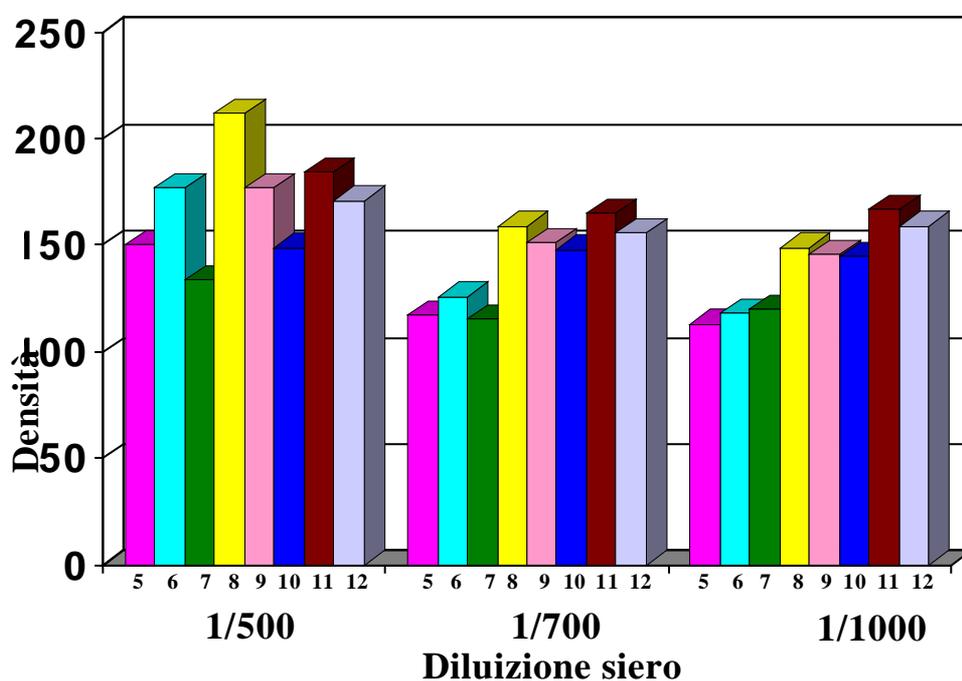


Fig. 10 – Valori di densità ottenuti con 0,4 µg di PARPS_{so} e Ab 2° dil. 1/10000 v/v.

II. 8 Specificità degli anticorpi presenti nei sieri nei confronti dell' antigene non purificato.

Sulla base dei risultati ottenuti l' antigene PARPS_{so} purificato all' omogeneità si è rivelato ottimale per il riconoscimento degli anticorpi anti-PARP presenti nel siero da sangue periferico umano.

La specificità degli anticorpi anti-PARP presenti nei sieri nel riconoscere la PARP eucariotica e la PARPS_{so} batterica è stata confermata ulteriormente utilizzando anche gli estratti grezzi dei due campioni. Insieme ai sieri 01 e 04, che hanno precedentemente mostrato elevati livelli di anticorpi anti-PARP, sono stati presi in esame i sieri 13, 14, 15, 16, 17 e 18. In particolare, ciascun filtro di PVDF preparato con uguali quantità (20 µg) di **sopranatante** DNasi da *S. solfataricus* e di estratto nucleare da ratto è stato incubato, con ciascuno dei sieri.

Le immunorivelazioni con l' antigene eucariotico, hanno evidenziato la capacità, per tre di essi, (01, 04 e 13) di riconoscere una banda netta a 116 kDa in corrispondenza di quella ottenuta con gli anticorpi commerciali (**cap. I**); nei restanti sieri, quattro (14, 15, 16 e 17) hanno riconosciuto molto debolmente una banda a circa 25 kDa, corrispondente al peso molecolare del frammento apoptotico più piccolo dell' enzima PARP1 eucariotico, e nel siero 18 non è apparso alcun segnale (**Fig. 11**).

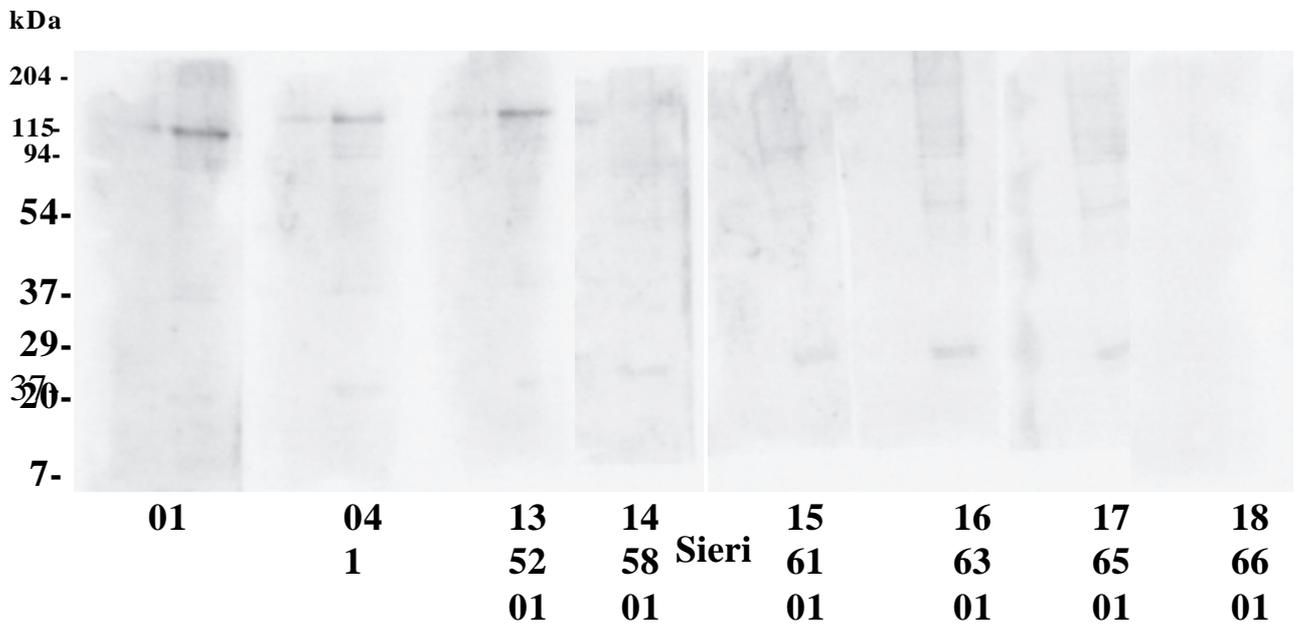


Fig. 11 – Estratto nucleare da testicolo di ratto (20 µg)
Immunosegnali ottenuti con i sieri dil. 1/500 (v/v) e Ab 2° dil. 1/10000 (v/v).

L'immunorivelazione effettuata con gli stessi sieri sul sopranatante DNasi di *S. solfataricus* ha evidenziato un segnale significativo per tre di essi (01, 04 e 13). La **Fig. 12** mostra il risultato ottenuto per il siero 04, e che si è ripetuto anche con i sieri 01 e 13. Tale risultato, confrontato con quello ottenuto utilizzando l' anticorpo commerciale antiPARP diretto contro il sito catalitico (**Cap. I**), ha confermato la presenza di un segnale a circa 90 kDa corrispondente al dimero che la PARP_{So} forma in soluzione. I restanti sieri (14, 15, 16, 17 e 18) non hanno mostrato alcun segnale.



Fig. 12 – Sopranatante DNasi I da *S. solfataricus* (20 µg).
Immunosegnale ottenuto con siero dil. 1/500 (v/v) e Ab 2° 1/10000 (v/v).

Lo stesso esperimento ripetuto in presenza dell' antigene PARP_{So} purificato all' omogeneità ha messo in evidenza, per i primi tre sieri ma non per gli altri, un segnale a 46,5 kDa, corrispondente al peso molecolare dell' enzima nativo (dati non mostrati).

II. 9 Analisi dei sieri mediante immuno dot-blot.

Sulla base dei risultati ottenuti l' enzima PARP_{So} (0,4 µg), purificato all' omogeneità, è stato utilizzato per analizzare *in cieco*, successivamente, l' intero gruppo di sieri secondo la procedura descritta nel paragrafo II. 3 e utilizzando come controllo negativo la BSA.

In **Fig. 13** è riportato il risultato ottenuto per 4 sieri (01, 04, 05 e 06), in cui il valore di densità ottenuto per la BSA è stato sottratto a quello di ciascun siero.

I dati densitometrici ottenuti, confrontati con il quadro biochimico-clinico degli stessi pazienti, fornito dal Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell' Università di Napoli Federico II, hanno evidenziato che la massima immunoreattività è risultata corrispondere a due sieri (01 e 04) con livelli ANA elevati (Autoimmuni) e affetti da LES, i restanti sieri (05 e 06) sono risultati provenire da soggetti ANA negativi (Controlli) (**Fig. 13**). Il confronto esteso all' intero gruppo di 18 sieri ha consentito l' identificazione del gruppo di sieri "Controllo" (05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12) e dei sieri "Autoimmuni" (01, 02, 03, 04, 13, 14, 15, 16, 17, 18), di cui, in particolare, i sieri (01, 04 e 13) sono risultati affetti da LES.

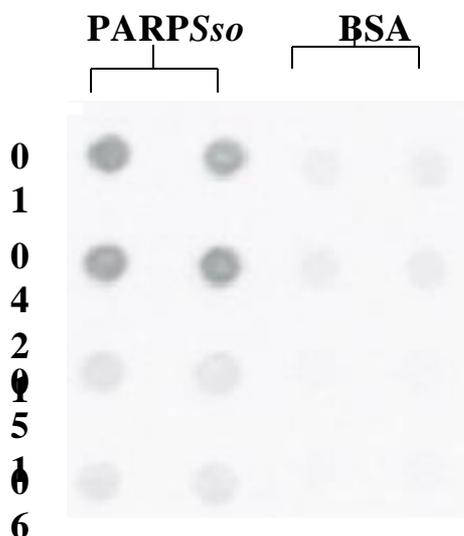


FIG. 13 – Capacità antigeniche della PARP_{So} nei confronti di sieri da soggetti "Autoimmuni" (01 e 04) e da donatori sani "Controlli" (05 e 06).

CONCLUSIONI

I risultati riportati hanno fornito indicazioni promettenti per l' utilizzo del termozima PARPS_{so} da *S. solfataricus* come antigene nel riconoscimento specifico di autoanticorpi anti-PARP nel siero di pazienti affetti da patologie autoimmuni.

L' analisi densitometrica dell' immunosegnale ottenuta per diluizioni crescenti del siero, con una quantità fissa di antigene PARPS_{so} purificato (0,8 µg), ha permesso di definire la diluizione ottimale del siero (1/500 v/v) che consente di poter apprezzare differenze significative nel contenuto di autoanticorpi anti-PARP.

A parità di diluizione dei sieri (1/500 v/v) e dell' anticorpo secondario (1/10000v/v), l' ulteriore riduzione della quantità di antigene immobilizzato (0,4µg), oltre a confermare la riproducibilità dei risultati, ha fatto rivelare differenze più marcate tra i valori delle densità relative, con un aumento della sensibilità del saggio.

L' analisi eseguita a parità di proteine caricate (20µg), utilizzando preparati grezzi degli enzimi PARPS_{so} e PARP eucariotica, ha evidenziato in alcuni sieri (01, 04 e 13) la presenza di immunoglobuline specifiche dirette contro la PARP eucariotica confermata dall' immunosegnale a 116 kDa, paragonabile a quello ottenuto con l' anticorpo commerciale diretto contro il sito catalitico dell' enzima. Gli stessi sieri testati con l' estratto sulfobale grezzo e con l' enzima PARPS_{so} purificato hanno mostrato un segnale evidente, rispettivamente, a 90 kDa corrispondente al dimero della PARPS_{so} (**Fig. 12**) e a 46,5 kDa (dato non mostrato). Tale risultato, conferma la capacità antigenica del termozima PARPS_{so} nei confronti degli anticorpi anti-PARP. Esso pur avendo dimensioni ridotte in quanto manca del dominio N-terminale reagisce con gli autoanticorpi anti-PARP in maniera paragonabile alla PARP eucariotica [*Faraone-Mennella MR.. e coll. (1996)*]. Dal confronto dei dati densitometrici con il profilo biochimico-clinico i sieri 01, 04 e 13 sono risultati provenire da soggetti affetti da LES; pertanto, tale risultato è in linea con dati di letteratura [*Jeoung D. e coll., (2004)*] in cui il frammento ricombinante (ADPCF), corrispondente al sito catalitico dell' enzima, risulta essere il più immunoreattivo rispetto ad altri domini strutturali della PARP, e quello che meglio discrimina i sieri LES da quelli affetti da malattie autoimmunitarie diverse (**Fig. 3**).

Tuttavia, il dato più interessante è stato quello ottenuto con i sieri (14, 15, 16, 17) risultati appartenere al gruppo degli " Autoimmuni" non affetti da LES. Essi, in presenza dell' antigene eucariotico grezzo, hanno mostrato un segnale a 25 kDa (**Fig. 11**) probabilmente corrispondente al frammento apoptotico più piccolo della PARP e non hanno evidenziato alcuna positività sul sopranatante DNasi da *S. solfataricus*.

L' assenza nel soprannatante DNasi I da *S. solfataricus*, al contrario della PARP-1, di frammenti proteolitici che possono venire riconosciuti da autoanticorpi circolanti nel siero di pazienti con altre forme autoimmunitarie, ha portato ad una maggiore evidenza dell' autentica specificità del termozima PARP_{So} e ne giustifica l' utilizzo come marcatore diagnostico per il LES.

III CAPITOLO

Analisi statistiche

L'enzima PARP_{Sso}, purificato da *S. solfataricus*, è stato utilizzato come antigene per il dosaggio immunochimico di autoanticorpi anti-PARP nel siero di un gruppo di pazienti affetti da LES, in diverse fasi cliniche di attività della malattia.

I sieri di 67 soggetti sono stati raccolti, ciascuno diviso in due aliquote, presso il Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, e conservati a -80°C.

Una aliquota di ciascun siero è stata utilizzata, presso lo stesso Dipartimento, per l'analisi dei livelli degli ANA e degli ENA, mediante la metodica classica (IFI) e ELISA, rispettivamente. Inoltre, è stato valutato l'indice di attività della malattia (SLEDAI_{2K}). L'altra aliquota di ciascun siero è stata analizzata *in cieco*, mediante immuno dot-blotting, per la determinazione degli anticorpi anti-PARP, presso il Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale.

La prima fase di questa analisi ha riguardato l'acquisizione dei dati densitometrici e la valutazione della variabilità della risposta immunitaria nei confronti dell'antigene PARP_{Sso}.

Successivamente, al fine di migliorare l'interpretazione di tutti i risultati ottenuti, i valori dell'attività anti-PARP, dell'indice SLEDAI_{2K} e dei livelli di ANA sono stati confrontati ed analizzati utilizzando test statistici appropriati che tenevano conto della distribuzione non gaussiana dei dati.

MATERIALI E METODI

III. 1 Raccolta dei sieri

L'analisi dell'attività anti-PARP è stata eseguita analizzando *in cieco* i sieri di 67 soggetti (2 maschi e 65 femmine). I sieri provenienti da pazienti affetti da LES sono stati classificati secondo i criteri dell'Associazione Americana per i Reumatismi (ARA) del 1982 [Tan EM. e coll., (1982)] e divisi, in base all'attività di malattia, secondo l'Indice di Attività di Malattia del Lupus Eritematoso Sistemico (SLEDAI)-2K [Bombardier C. e coll., (1992)]. I sieri dei donatori sani, prelevati presso il centro trasfusionale, sono stati selezionati per l'età e per il sesso. Tutti i sieri sono stati divisi in due aliquote e conservati a -80°C fino all'uso. Le due aliquote di ciascun siero sono state analizzate separatamente mediante IFI e ELISA nel Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, e con il saggio immunochimico, per la ricerca degli anticorpi anti-PARP, presso il Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale.

III. 2 Analisi dei sieri, a diverse diluizioni, mediante IFI, ELISA e immuno-dot-blot

Gli anticorpi antinucleo (ANA) sono stati determinati in ciascun siero secondo [Molden DP. e coll., (1984)], utilizzando il metodo classico per Immuno Fluorescenza Indiretta (IFI) e quelli anti ds-DNA secondo [Smeenk R. e coll., (1992)], come riportato nel paragrafo II.1 di Materiali e Metodi. La presenza di anticorpi anti-ENA è stata determinata usando il saggio ELISA [Maddison PJ. e coll., (1985)], Materiali e Metodi paragrafo II.1. Inizialmente le suddette analisi sono state eseguite ad una diluizione dei sieri 1/40 v/v. Ciascun siero risultato positivo, è stato sottoposto ad una progressiva diluizione (1/80; 1/160; 1/320; 1/640 v/v), fino ad ottenimento di una risposta negativa. La ricerca degli anticorpi anti-PARP con l'antigene PARP_{SSO} è stata eseguita mediante immunodot-blotting, secondo la procedura descritta nel paragrafo II. 7. Infine, le relative densità ottiche, unitamente ai dati sperimentali ottenuti con le tecniche IFI e ELISA, sono state confrontate con le diagnosi cliniche dei singoli pazienti.

III. 3 Analisi statistica

Le variabili prese in considerazione per l' analisi statistica sono di tipo categorico o continuo. Le tabelle di contingenza 2 x 2 sono state analizzate con il test del chi quadrato (X^2) o con il test esatto di Fisher quando alcune frequenze attese erano <5 . Per tabelle di contingenza più grandi è stato utilizzato il test del chi quadrato con la correzione esatta, in quanto in alcune caselle le frequenze attese erano inferiori ad 1 ed in più del 20% inferiori a 5 [Stanton A. Glantz. IV edizione McGraw-Hill]. Le variabili continue (età, attività anti-PARP e SLEDAI-2K) sono state espresse come mediane e range interquartile (IQR). Il confronto dei dati relativi ai gruppi di pazienti è stata effettuata mediante il test non parametrico di Mann-Whitney.

Per stabilire un valore soglia dell' attività anti-PARP in grado di discriminare tra pazienti con LES attivo da quelli con LES inattivo (classificati sulla base dello SLEDAI-2K), e per evidenziare il grado di accuratezza del test, è stata costruita una curva della Caratteristica Operativa del Ricevitore (curva ROC). La curva ROC è una rappresentazione grafica del rapporto inverso tra sensibilità e specificità: la sensibilità, o tasso dei veri positivi, viene tracciata rispetto a $(1 - \text{specificità})$, ossia al tasso dei falsi positivi, secondo lo spostamento del valore soglia da una estremità all' altra dell' area di sovrapposizione. Se il test fosse perfetto non mostrerebbe alcuna sovrapposizione di risultati positivi e negativi, e come risultato vi dovrebbero essere il 100% di veri positivi (sensibilità) e non esserci falsi positivi. Un test inutile è quando l' area sotto la curva è minore del 50% . Sulla base del valore soglia ottenuto mediante la curva ROC i pazienti LES sono stati classificati in “positivi” (con attività anti-PARP al di sopra del cut-off) e un gruppo di soggetti “negativi” (con attività anti-PARP al di sotto del cut-off).

Infine, nei pazienti con LES è stata correlata la variabile relativa all' attività anti-PARP con i livelli ANA e lo SLEDAI-2K, con il calcolo del coefficiente di correlazione di Spearman ed i livelli di significatività.

Tutte le analisi sono state eseguite con il software SPSS, versione 15.0.0. L' analisi ROC è stata ottenuta con il software statistico StatsDirect (versione 2.6.2).

RISULTATI

III. 4 Analisi della attività anti-PARP, nei sieri di pazienti affetti da LES e nei controlli

Le condizioni di saggio definite nel Cap. II paragrafo II. 7, per la ricerca degli anticorpi anti-PARP, sono state utilizzate per l'analisi, *in cieco*, mediante dot-blot dei 67 sieri a disposizione. Il confronto dei valori densitometrici ottenuti, con i dati anamnesici e il profilo biochimico-clinico dei singoli soggetti, ha consentito di stabilire che 23 sieri provenivano da soggetti sani ANA⁻ (Controlli, 1 maschio e 22 femmine), i restanti 44 sieri sono risultati appartenere a soggetti ANA⁺ (affetti da LES, 1 maschio e 43 femmine).

La media dei valori delle densità ottiche relative ai 23 sieri (Controllo) e i singoli valori di densità misurati per i 44 sieri (LES) sono stati riportati in grafico. L'analisi ha rivelato un quadro piuttosto variabile per quanto riguarda i livelli di autoanticorpi anti-PARP nei campioni esaminati. Infatti, il 27% dei sieri ha presentato livelli di anticorpi anti-PARP pressoché uguali o inferiori alla media dei controlli, pur essendo risultati elevati i relativi livelli di ANA (Fig. 14).

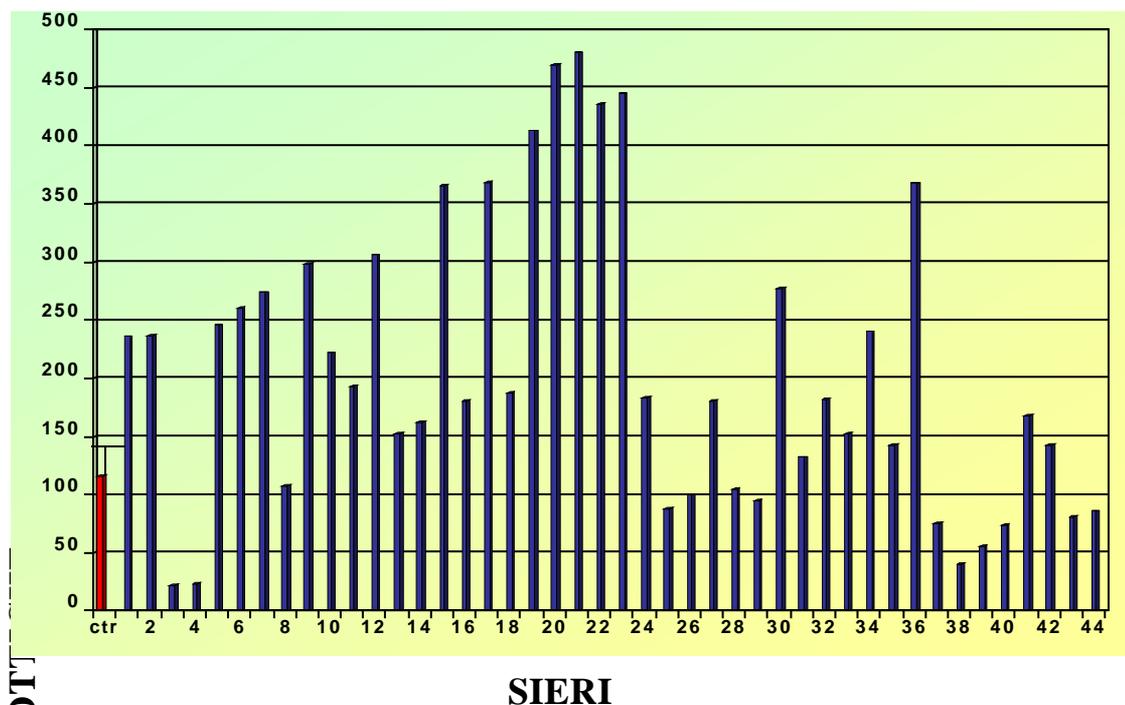


Fig. 14 - Istogramma dei valori di densità ottica di sieri da pazienti con patologie autoimmuni.

ctr. = media dei controlli; D.O. = 116 σ = 32

Dal profilo biochimico-clinico è emerso che tutti i soggetti affetti da LES possedevano almeno quattro degli 11 criteri citati nella tabella ARA del 1982 (Tab. I), [Tan EM. e coll., (1982)] e valori dell'indice SLEDAI-2K diversi. Tuttavia, l'ampia variabilità dei livelli di

autoanticorpi anti-PARP, registrata per i sieri LES, è risultata inizialmente non facilmente interpretabile, pur essendo perfettamente in accordo con numerosi dati riportati precedentemente in letteratura [Jeoung D. e coll., (2004)].

Per disporre di una diversa chiave di lettura dei dati acquisiti (età, livelli ANA, attività anti-PARP, SLEDAI-2K, indici infiammatori), si è reso necessario, pertanto, individuare nuovi parametri di tipo statistico con i quali analizzarli.

III. 5 Calcolo del valore soglia dell'attività antiPARP mediante la curva della Caratteristica Operativa del Ricevitore (curva ROC).

Sulla base dei valori di SLEDAI-2K i pazienti sono stati classificati come attivi o inattivi. L'attività antiPARP è stata analizzata su 44 sieri di pazienti affetti da LES. Una curva ROC, come riportato in Mat. e Met., paragrafo III. 3, ha permesso di calcolare il valore soglia di densità (cut-off = 168) che consente di apprezzare con quale efficienza gli anticorpi anti-PARP siano in grado di discriminare i pazienti con LES in fase inattiva (al di sotto del cut-off) da quelli con LES in fase attiva (al di sopra del cut-off), già classificati sulla base dello SLEDAI-2K (**Fig. 15**). L'area sottesa dalla curva rappresenta l'efficienza con cui il saggio immunochimico riconosce i sieri affetti da LES (73%). Sono stati mostrati anche i valori di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e valore predittivo negativo con i rispettivi intervalli di confidenza (CI) del 95%, per il valore di densità cut-off di 168.

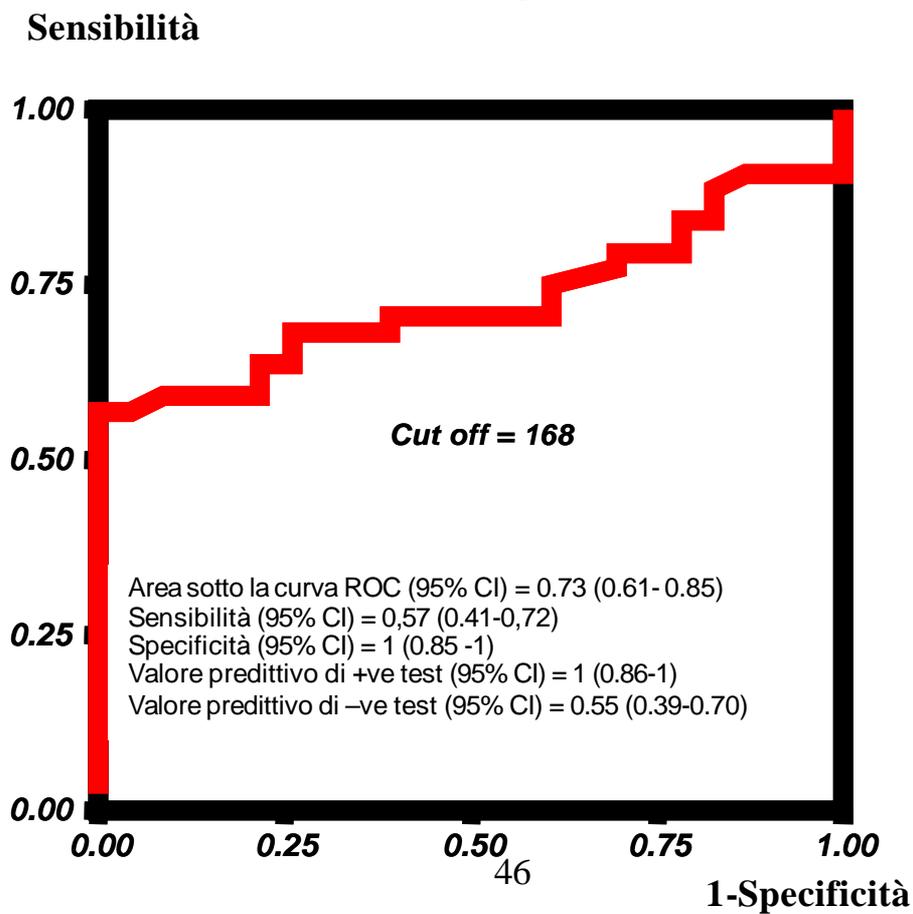


Fig. 15 Curva ROC della specificità (falsi positivi) in funzione della sensibilità (veri positivi) dell' attività anti-PARP, in sieri di pazienti con LES.

III. 6 Attività anti-PARP, classe degli ANA e SLEDAI, in pazienti con il LES attivo e inattivo

L' analisi statistica dell' età di tutti i soggetti LES analizzati ha rivelato un valore mediano di 33 con IQR di 10. I donatori sani mediati per l' età e per il sesso hanno evidenziato una elevata correlazione rappresentata dai relativi valori di $p = 0,74$ e $1,00$ (dati non mostrati).

L' attività anti-PARP si è rivelata più alta nei pazienti ANA positivi (mediana 181, IQR 177) che nei controlli (mediana 122,5, IQR 62), con $p = 0,005$ (dati non mostrati).

Nel gruppo dei sieri LES, lo SLEDAI e l' attività anti-PARP sono risultati significativamente più incrementati nei pazienti con malattia in forma attiva che in quelli con forma inattiva, con una correlazione elevata ($p < 0,001$ e $p = 0,005$, rispettivamente), come si osserva in **Tab. III**.

I livelli ANA, determinati mediante IFI, sono risultati negativi nei sieri dei soggetti sani, mentre quelli dei pazienti con il LES sono risultati positivi in tutti i casi, alla diluizione di $1/40$ v/v. L' analisi eseguita a diluizione progressivamente maggiore ha rivelato 1 siero positivo alla diluizione $1/40$, 12 sieri positivi a $1/80$, 15 sieri positivi a $1/320$ e 1 siero positivo a $1/640$ (**Tab. III**).

Nell' ambito dei soggetti affetti da LES, 16 sono risultati in fase inattiva di malattia, con un valore mediano dello (SLEDAI)-2K = 4 e un IQR = 2, di cui il 50% è risultato positivo alla diluizione $1/80$ degli ANA; 28 soggetti sono risultati con una forma attiva di malattia, con un valore mediano dello (SLEDAI)-2K = 10 e un IQR = 6, di cui il 50% positivi alla diluizione di $1/160$ degli ANA.

Il 31,3% dei pazienti LES in fase inattiva ha mostrato una attività anti-PARP anormale (sopra il cut-off), mentre nei soggetti affetti da una forma attiva della malattia il 67,9% ha mostrato una attività anti-PARP anormale.

	LES		p
	Inattivi (n = 16)	Attivi (n = 28)	
Anti-PARP, mediana (IQR)	147,5 (101)	241,5 (233)	0,005
Anti-PARP, n (%)			0,02
Normali	11 (68,8)	9 (32,1)	
Anormali	5 (31,3)	19 (67,9)	
Classe degli ANA, n (%)			0,004
1:40	1 (6,3)	0 (0)	
1:80	8 (50)	4 (14,3)	
1:160	1 (6,3)	14 (50)	
1:320	6 (37,5)	9 (32,1)	
1:640	0 (0)	1 (3,6)	
SLEDAI, mediana (IQR)	4 (2)	10 (6)	<0,001

Tab. III – Attività anti-PARP, livelli ANA e SLEDAI in pazienti con LES attivo e inattivo.

III. 7 Correlazione tra attività anti-PARP e SLEDAI-2K e anti-PARP e classe di ANA, in pazienti con LES

I valori dell'attività anti-PARP, dei livelli ANA e dell'indice SLEDAI2K nei pazienti LES sono stati utilizzati per l'analisi della correlazione secondo Spearman. Lo studio della correlazione tra attività anti-PARP e SLEDAI-2K, nei pazienti con LES, è risultato statisticamente significativo ($r = 0.74$, $p < 0.001$). La distribuzione dei valori, riportata in **Fig. 16** mostra una evidente correlazione tra l'incremento dell'attività anti-PARP e l'indice SLEDAI-2K, confermata dal valore di r tendente all'unità.

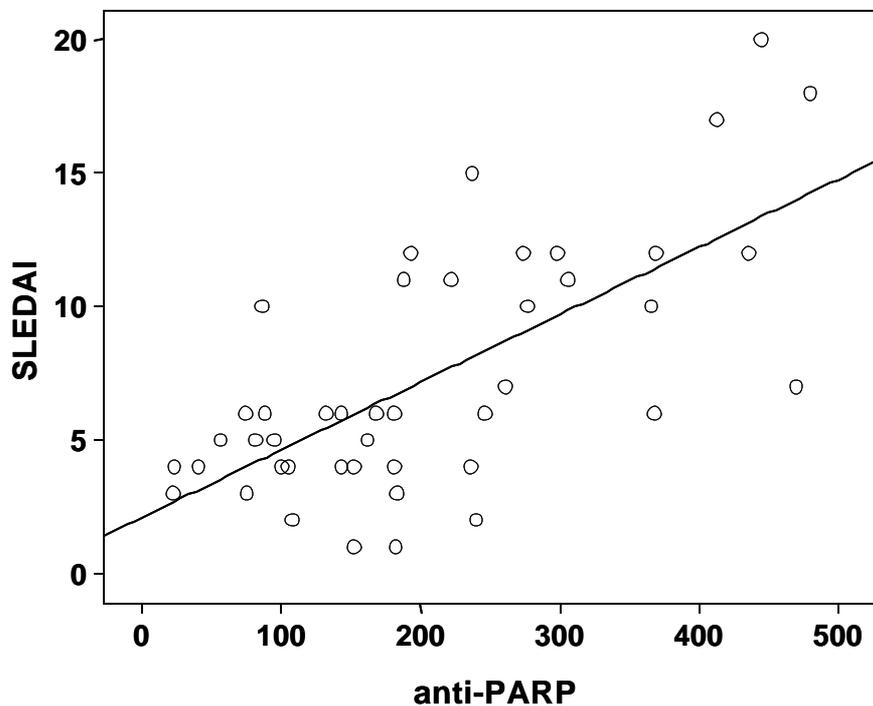


Fig. 16 – Correlazione di Spearman tra attività anti-PARP e SLEDAI nei pazienti con LES ($r = 0.74$; $p < 0.001$).

La stessa analisi eseguita riportando i livelli ANA in funzione dell'attività anti-PARP non ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa ($r = 0.12$, $p = 0.58$). Come si osserva dal grafico in **Fig. 17**, i livelli ANA possono restare elevati anche quando l'attività anti-PARP risulta molto bassa.

Similmente, la rivelazione di altri anticorpi (anti-ds DNA e frazioni ENA) non hanno evidenziato alcuna correlazione con gli anticorpi anti-PARPS_{so} (dati non riportati).

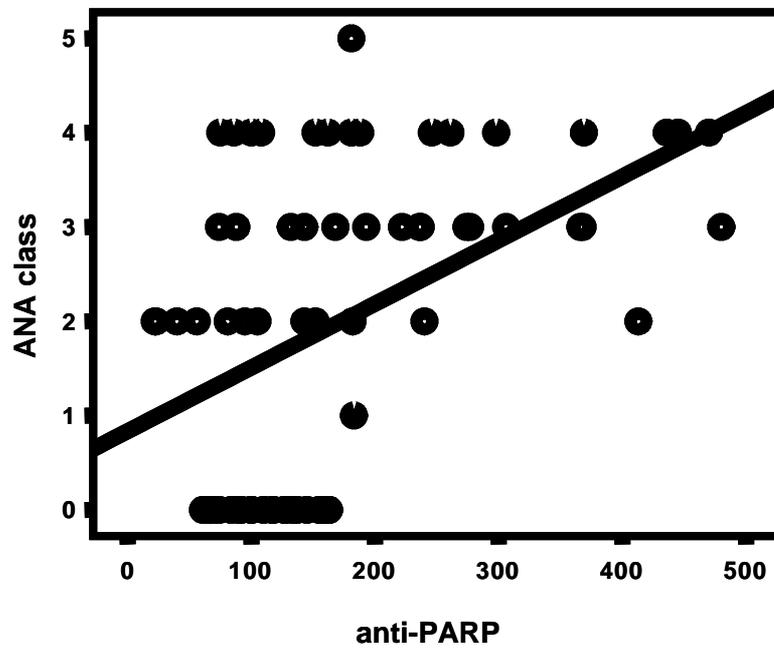


Fig. 17 – Correlazione di Spearman tra livelli ANA e attività anti-PARP nei pazienti LES ($r = -0.12$; $p = 0.58$).

Il confronto delle frequenze delle variabili cliniche nei soggetti LES con attività anti-PARP positiva (al di sopra del cut-off) ed in quelli con attività negativa (al di sotto del cut-off), ha evidenziato nei pazienti attivi una maggiore frequenza di pleurite ($p = 0,05$), febbre ($p = 0,03$), e vasculite ($p = 0,03$) (**Tab. IV**).

PARP			
Variabili	Negativi	Positivi	Valore di p
	(n = 20)	(n = 24)	
Convulsioni	0 (0)	0 (0)	-
Psicosi	0 (0)	0 (0)	-
Ischemia cerebrale	0 (0)	0 (0)	-
Disturbi visivi	0 (0)	0 (0)	-
Sofferenza dei nervi cranici	0 (0)	0 (0)	-
Cefalea	0 (0)	0 (0)	-
Problemi cardio-vascolari	0 (0)	3 (12.5)	0.24
Vasculiti	0 (0)	6 (25)	0.03*
Artrite	0 (0)	0 (0)	-
Miosite	0 (0)	1 (4.2)	1.00
Cilindri urinari	0 (0)	0 (0)	-
Ematuria	0 (0)	0 (0)	-
Proteinuria	7 (35)	12 (50)	0.32
Piuria	0 (0)	0 (0)	-
Rash	1 (5)	1 (4.2)	1.00
Alopecia	3 (15)	1 (4.2)	0.32
Mucosite	0 (0)	3 (12.5)	0.24
Pleurite	0 (0)	5 (20.8)	0.05*
Pericardite	2 (10)	7 (29.2)	0.15
Consumo dei complementi	10 (50)	13 (54.2)	1.00
Anticorpi anti-DNA	11 (55)	8 (33.3)	0.15
Febbre	3 (15)	11 (45.8)	0.03*
Trombopenia	1 (5)	6 (25)	0.11
Leucopenia	7 (35)	11 (45.8)	0.47

Tab IV – Variabili cliniche testate. I dati sono espressi in n (%). Test statistico utilizzato: test del chi-quadrato o test esatto di Fisher.

CONCLUSIONI

L'analisi dei dati anamnestici dei singoli soggetti analizzati, ha rivelato che la maggior parte di essi risultano di sesso femminile (98%) e di età media. La distribuzione del sesso e dell'età riscontrata risulta in accordo con l'elevata incidenza del LES nella popolazione femminile in età fertile [Hochberg MC., (1997)].

I valori di densità ottica, ottenuti per i singoli sieri LES, hanno mostrato un andamento variabile, con il 27% dei soggetti che presentano un'attività antiPARP inferiore alla media. Inizialmente, tale risultato non è stato facilmente interpretabile, pur essendo in linea con precedenti dati riportati in letteratura, in cui veniva utilizzato l'enzima PARP come antigene, in presenza di sieri di pazienti affetti da LES [Negri C. e coll., (1990)], [Jeoung D. e coll., (2004)].

Per definire in maniera più precisa i dati acquisiti nel corso di questa ricerca, è stato necessario utilizzare alcuni parametri statistici che hanno permesso di interpretare i risultati ottenuti in maniera più chiara, sotto un profilo biochimico-clinico.

Un approccio interessante nell'interpretazione dei risultati riguarda il confronto dell'attività antiPARP con l'indice di attività della malattia (SLEDAI-2K) di ogni paziente.

Utilizzando come parametro di riferimento l'indice di attività della malattia (SLEDAI-2K), l'attività antiPARP ha mostrato una elevata specificità nel distinguere le forme di LES attivo (al di sopra del cut-off) da quelle di LES non attivo (al di sotto del cut-off), come si evince dal grafico in **Fig. 15**.

Inoltre, il saggio ha mostrato sensibilità prossima al valore massimo nel discriminare all'interno del gruppo dei LES non attivi, i pazienti in fase di remissione della malattia.

Da una indagine statistica parallela, i rispettivi valori mediani, dell'attività antiPARP e dell'indice SLEDAI-2K sono risultati più incrementati nei soggetti affetti da LES in forma attiva rispetto ai soggetti con forme inattive della malattia. Inoltre, la maggior parte dei soggetti affetti da LES attivo (67,9%) ha mostrato una attività anti-PARP "anormale", cioè al di sopra del cut-off, in accordo con l'elevata specificità rilevata dall'analisi eseguita mediante la curva ROC. Viceversa i livelli ANA hanno mostrato valori indipendenti dallo stato della malattia, **Tab. III**.

La correlazione tra l'attività antiPARP e l'indice SLEDAI-2K osservata nell'analisi precedente, è stata ulteriormente confermata elaborando i valori delle densità ottiche dell'attività antiPARP secondo il metodo statistico di Spearman. La stessa analisi eseguita anche per i livelli ANA ha confermato l'assenza di una correlazione diretta di essi con l'attività antiPARP.

Infine, l'analisi delle frequenze di variabili cliniche ha evidenziato un più frequente riscontro degli indici di infiammazione (febbre, pleurite e vasculite) nei soggetti anti-PARP positivi rispetto a quelli negativi.

Il confronto dei risultati ottenuti mediante le analisi statistiche con il profilo biochimico-clinico ha consentito, per la prima volta, di poter dare una spiegazione significativa alla variabilità dell'attività anti-PARP nel siero dei soggetti affetti da LES. Tale variabilità dipende dalle fasi di attività in cui la malattia può trovarsi a seguito di trattamento farmacologico.

Infatti, nel siero dei pazienti con LES in forma inattiva (a seguito di prolungato trattamento immunosoppressivo e/oppure con chiari sintomi clinici di remissione della malattia, i livelli degli anticorpi anti-PARP calano drasticamente, anche se i livelli ANA rimangono ancora alti.

DISCUSSIONE

La definizione di nuovi marcatori sierologici per il monitoraggio e/oppure per la valutazione della presenza di LES in soggetti affetti da patologie autoimmuni, è ancora un argomento controverso.

La metodica classica per Immuno Fluorescenza Indiretta (IFI), comunemente utilizzata in campo clinico, permette il dosaggio degli anticorpi antinucleo (ANA), che, come dimostrato, sono un indice inequivocabile della presenza di una patologia autoimmunitaria di tipo LES, soprattutto se abbinati ad elevati livelli di anticorpi anti-DNA, ENA (antigeni nucleari estraibili), al quadro di manifestazioni cliniche identificato con i criteri ARA e con l' indice di attività della malattia (SLEDAI-2K). Tuttavia, la presenza di ANA non sempre è specifica per il LES, ma si può riscontrare in numerose altre patologie a carico del tessuto connettivo (artrite reumatoide, sclerodermia, dermatomiositi, etc.) [Karamelic J. e coll., (2007)], con attività autoimmunitaria elevata, e non sempre correlabile al LES.

Al contrario, numerose ricerche hanno riportato casi di pazienti affetti da forme attive di LES, con inequivocabili manifestazioni cliniche (nefropatie, elevati livelli di ENA circolanti, proteinuria, ipertensione) ma risultati negativi per la presenza degli ANA, [Koarada S. e coll., (2005)], [Davis JM. e coll., (2005)], [Ozdemir FN. e coll., (2005)].

I risultati riportati in questo lavoro di ricerca forniscono, per la prima volta, indicazioni promettenti per l' utilizzo di un termozima di tipo PARP, da *S. solfataricus*, come antigene nel riconoscimento specifico di anticorpi anti-PARP nel siero di pazienti affetti da patologie autoimmuni, in particolare da LES.

L' immunosegnale ottenuto utilizzando preparati grezzi degli enzimi PARP_{so} e PARP eucariotica, immobilizzati per diversi giorni su membrana PVDF, ha confermato la termostabilità dell' enzima PARP_{so} e la sua capacità di conservare inalterata, per tempi piuttosto lunghi, la cross-reattività con gli anticorpi policlonali anti-PARP (**Tab. II**). La mancanza, nell' antigene sulfobale del dominio Nterminale [Faraone-Mennella MR. e coll., (1998)] e l' assenza di frammenti proteolitici che possono essere riconosciuti da autoanticorpi circolanti nel siero di pazienti con altre forme autoimmunitarie (parag. II. 9), conferisce al termozima l' assoluta specificità nel riconoscere i sieri affetti da LES. Tale risultato ha trovato conferma in precedenti dati di letteratura in cui il sito catalitico dell' enzima PARP-1 è risultato essere il più immunoreattivo e quello che discrimina meglio i sieri LES da altre forme autoimmunitarie [Jeoung D. e coll., (2004)].

Esiste un numero notevole di dati di letteratura circa il coinvolgimento della poli-ADPriboseilazione nel LES [Muller S. e coll., (1994)]. Molti lavori hanno riportato i risultati di

immunosaggi che riconoscono nei sieri autoimmuni gli anticorpi diretti contro il prodotto di questa reazione, il poliADPR (PAR), [Okolie EE. e coll., (1979), [La Page SH., e coll., (1990)]. Comunque, la sensibilità e la specificità di questi saggi è risultata dipendere dalla lunghezza della catena dell' antigene; infatti, gli anticorpi non riconoscono le catene corte di PAR (45 residui).

Più scarse sono le conoscenze circa l' utilizzo della poliADPRpolimerasi come antigene nella ricerca di autoanticorpi ed, in ogni caso, sono state adottate metodiche differenti (ELISA, western-blotting, attività enzimatica), [Negri C. e coll., (1990)], [Decker P. e coll., (1998)], [Lim Y. e coll., (2002)], [Bohm I., (2006)], da quelle riportate nel presente lavoro.

Nessun lavoro in precedenza, eccetto i risultati di questa ricerca, ha riportato la stretta correlazione dei livelli degli anticorpi anti-PARP con l' attività della malattia, attraverso una dettagliata analisi statistica. I risultati da noi ottenuti mettono in chiara evidenza che gli ANA rimangono ancora elevati quando è evidente una netta remissione della malattia, laddove, invece, gli anticorpi anti-PARP decrescono parallelamente al diminuire della attività del LES. Infatti, dai valori di densità interpretati mediante la curva ROC, il termozima PARP_{SSo}, ha mostrato una elevata specificità nel distinguere le forme di LES attivo e una sensibilità prossima al valore massimo nel discriminare, all' interno del gruppo dei LES non attivi, i pazienti in fase di remissione della malattia (**Fig. 15**).

L' attività anti-PARP, nel siero dei pazienti con forme di LES attivo, è risultata aumentare in maniera proporzionale all' indice di attività della malattia (SLEDAI-2K) (**Fig. 16**).

Pertanto il confronto, mediante analisi statistiche, dei risultati del saggio immunochimico, con il profilo biochimico-clinico di ciascun paziente LES e con i relativi indici di attività della malattia (SLEDAI-2K) ha fornito una interpretazione significativa anche per quella quota di sieri (27%), i cui relativi valori di densità sono apparsi uguali o al di sotto dei valori medi dei controlli (**Fig. 14**). In realtà, si è trattato di campioni provenienti da pazienti in remissione della malattia.

La correlazione tra l' attività anti-PARP e l' indice SLEDAI-2K è stata ulteriormente confermata elaborando i valori delle densità ottiche secondo il metodo statistico di Spearman. La stessa analisi eseguita, per i livelli ANA, ha confermato l' assenza di una correlazione diretta di essi con l' attività anti-PARP.

Sulla base dei risultati ottenuti, la variabilità della concentrazione degli anticorpi anti-PARP nel siero dei pazienti con LES attivo e inattivo, potrebbe essere correlata alla capacità delle cellule danneggiate di riparare il danno al DNA ed evitare la morte per apoptosi [Mok CC. & Lau CS., (2003)].

E' ben noto che a seguito di un esteso danno, il DNA non è riparabile e la PARP è proteolizzata dalle caspasi che ne impediscono il suo ruolo di *guardiano del genoma* [Muller S. e coll., (1994)], [Biji M. e coll., (2001)], [Scovassi AI. & Poirer GG., (1999)].

D' altra parte, la presenza degli anticorpi anti-PARP sul dominio NLS dell' enzima impedisce la proteolisi da parte della caspasi-3, prolungando la sopravvivenza delle cellule apoptotiche, la cui permanenza in circolo favorisce l' insorgenza dei fenomeni di flogosi alla base delle patologie autoimmunitarie [Decker P. e coll., (2000)].

Queste osservazioni sembrano dare maggiore interesse all' utilizzo del metodo immunochimico, preso in esame, il quale non solo ha evidenziato una stretta correlazione tra i livelli di anticorpi anti-PARP e l' attività di malattia del LES ma, tra i criteri SLEDAI, ha identificato tre indici di flogosi (vasculite, febbre e pleurite) come principali responsabili degli elevati livelli dei suddetti anticorpi.

In merito a quest' ultima osservazione, un elemento interessante è fornito da una recente analisi che ha evidenziato una associazione significativa del polimorfismo del gene PARP con l' insorgenza dei processi infiammatori alla base dell' nefriti e delle artriti nei soggetti affetti da LES [Hur JW., e coll. (2006)].

Pertanto, alla luce di tutte queste conoscenze e dei risultati ottenuti dalla presente ricerca, il saggio immunochimico, che utilizza il termozima PARP_{Sso}, sembra in grado di seguire meglio la fase di remissione della malattia rispetto agli ANA, determinati con la tecnica IFI.

Tuttavia, la rilevanza e la potenzialità diagnostica dei risultati della nostra ricerca impone una ulteriore conferma mediante l' analisi di un maggior numero di campioni.

BIBLIOGRAFIA

- *Amè JC., Spenlehauer C., and de Murcia G. **The PARP super-family**. *Bioessays* (2004) **26**, 882-893.
- Berg PA, Doniach D, Roitt IM. **Immunologic phenomena in liver disease: significance of mitochondrial antibodies**. *Klin Wochenschr.* (1969) **47** (24), 1297-307.
- *Biji M., Limburg PC., Kallenberg CG. **New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis**. *Neth. J. Med.* (2001) **59**, 66-75.
- Bohm I. **The apoptosis marker enzyme poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP in systemic lupus erythematosus**. *Z. Rheumatol.* (2006) **65**,(6) 541-544.
- Bombardier C., Gladman DD., Urowitz MB., Caron D., Chang CH. **Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE**. *Arthritis Rheum.* (1992) **35** (6), 630-40.
- *Botto M., Dell' Agnola C, Bygrave AE. **Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies**. *Nat. genet.* (1998) **19**, 56-59.
- *Bowness P., Davies KA., Norsworthy PJ., Athanassiou P., Taylor-Wiedeman J., Borysiewicz LK., Meyer PA., Walport MJ. **Hereditary C1q deficiency and systemic lupus erythematosus**. *Q.J. Med.* (1994) **87**, 455-464.
- *Burkle A. **Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosylation)**. *BioEssays* (2001) **23**, 795-806.
- *Caricchio R., Cohen PL. **Spontaneous and induced apoptosis in systemic lupus erythematosus: multiple assays fail to reveal consistent abnormalities**. *Cell Immunol.* (1999) **198**, 54-60.
- *Chiarugi A. **Poly(ADP-ribose) polymerase: killer or conspirator? The "suicide hypothesis" revisited**. *Trends Pharmacol. Sci.* (2002), **23**, 122-129.
- *Davis JM 3rd, Moder KG, Hamburger HA, Ytterberg SR. **Clinical features of 39 patients with antibodies to extractable nuclear antigens despite negative antinuclear antibodies: evidence for autoimmunity including neurologic and connective tissue diseases**. *Medicine (Baltimore)* (2005) **84** (4) 208-217.
- *Decker P., Isenberg D., Muller S. **Inhibition of caspase-3-mediated poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) apoptotic cleavage by human PARP autoantibodies and effect on cells undergoing apoptosis**. *J. Biol. Chem.* (2000) **275**, 9043-9046.
- *Decker P., Briand JP., de Murcia G., Pero RW., Isenberg DA., Muller S. **Zinc is essential for recognition of the DNA binding domain of poly(ADP-ribose)polymerase by antibodies in autoimmune rheumatic and bowel disease**. *Arthritis Rheum.* (1998) **41** (5), 918-926.
- de Murcia G. and Menissier-de Murcia J. **Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick sensor**. *Trends Biochem. Sci.* (1994) **19**, 172-176.
- *Emlen W., Niebur J., Madera R. **Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus**. *J. Immunol.* (1994); **152**: 3685-92.
- *Faraone-Mennella MR., Gambacorta A., Nicolaus B., and Farina B. **Immunochemical detection of ADP-ribosylating activity from *S. solfataricus***. *FEBS Letters* (1996) **378**, 199-201.
- *Faraone-Mennella M.R., Castellano S., De Luca P., Discenza A., Gambacorta A., Nicolaus B, e Farina B. **Comparison of the ADP-ribosylating thermozyyme from *Sulfolobus solfataricus* and the mesophilic poly(ADP-ribose) polymerases**. *FEMS Mic. Lett.* (2000) **192**, 9-14.

- *Faraone-Mennella MR., De Maio A., Petrella A., Romano M., Favalaro P., Gambacorta A., Lama L., Nicolaus B. and Farina B. **The (ADP-ribosylation) reaction in the thermophilic bacteria** *Res. Microbiol.* (2006) **157**, 531-537.
- *Faraone-Mennella M.R., Gambacorta A., Nicolaus B, e Farina B. **Purification and biochemical characterization of (ADP-ribose) polymerase-like enzyme from the thermophilic archaean.** *Biochem. J.* (1998) **334**, 1-7.
- Faraone-Mennella MR., Roma G., Farina B. **Active poly(ADPribose) metabolism in DNase- and salt-resistant rat testis chromatin with high transcriptional activity/competence.** *J. Cell. Biochem.* (2003) **89**, 688-697.
- Filipski J., Leblanc J., Youdale T., Sikorska M. e Walzer P.R. **Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structures.** (1990) *EMBO J.* **9**, 1319-1327.
- Fisher AE., Hochegger H., Takeda S., Caldecott KW. **Poly(ADP-ribose) polymerase I accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase.** *Mol. Cell. Biol.* (2007) **27**, (15) 5597-605.
- Hochberg MC. (1997) **The epidemiology of systemic lupus erythematosus.** In *Duboi' s Lupus Erythematosus.* (Fallace DJ, and Hahn BH eds), Williams and Wilkins. pp 49-65.
- *Hur JW., Sung YK., Shin HD., Park BL., Cheong HS., Bae SC. **Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) polymorphisms associated with nephritis and arthritis in systemic lupus erythematosus.** *Rheumatol.* (2006) **45**, 711-717.
- *Jeoung D., Lim Y., Lee EB., Lee S., Kim HY., Lee H., Song YW. **Identification of autoantibody against poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) fragment as a serological marker in systemic lupus erythematosus.** *J. Autoimmun.* (2004) **22**, 87-94.
- Karamehic J., Subasic D., Gavrankapetanovic F., Zecevic L., Eminovic I., Memic S., Seric N., Drace Z. **The incidence of antinuclear antibodies (ANA) detected by in direct immunofluorescence assay (IFA) method.** *Med. Arh.* (2007) **61** (1) 16-19.
- Klinman DM., Shirai A., Ishigatsubo Y. **Quantitation of IgM and IgG- secreting B cells in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum.* (1991) **34**, 1404-10.
- *Koarada S., Ide M., Haruta Y., Tada Y., Ushiyama O., Morito F., Ohta A., Nagasawa K. **Two cases of antinuclear antibody negative lupus showing increased proportion of B cells lacking RP105.** *J. Rheumatol.* (2005) **32**, (3) 562-564.
- Korb LC, Ahearn JM. **Clq binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited.** *J. immunol.* (1997) **158**, 4525-8.
- *Lim Y., Lee DY., Lee S., Park SY., Kim J., Cho B., Lee H., Kim HY., Lee E., Song YW., Jeoung DI. **Identification of autoantibodies associated with SLE.** *Biochim. Biophys. Res. Commun.* (2002), **295**, 119-124.
- *La Page SH., Dudeney C., Shall S., Shoenfeld Y., Isenberg DA. **Disease specificity of antibodies to poly (ADP-ribose), their relationships to anti-DNA antibodies and to disease activity.** *Autoimmunity* (1990), **5**, 3, 169-177.

- Linker-Israeli M., Deans RJ., Wallace DJ. **Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis.** *J. Immunol.* (1991) **147**, 117-23.
- Maddison PJ., Skinner RP., Vlachoyiannopoulos P., Brennan DM., Hough D. **Antibodies to RNP, Sm, Ro(SSA) and La(SSB) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera.** *Clin. Exp. Immunol.* (1985) **62**, 337-45.
- *Mok CC., Lau CS. **Pathogenesis of systemic lupus erythematosus.** *J. Clin. Pathol.* (2003) **56**, 481-490.
- Molden DP., Nakamura RM., Tan EM. **Standardization of the immunofluorescence test for autoantibody to nuclear antigens (ANA): use of reference sera of defined antibody specificity.** *Am J. Clin. Pathol.* (1984) **82**, 57-66.
- Muller S., Briand JP., Barakat S., Lagueux J., Poirier GG., de-Murcia G., Isenberg DA. **Autoantibodies reacting with poly(ADP-ribose) and with a zinc-finger functional domain of poly(ADP-ribose) polymerase involved in the recognition of damaged DNA.** *Clin. Immunol. Immunopathol.* (1994) **73**, 187-196.
- Nazareth M., Fanti P., Schwach C., Poppenberg K., Janis K., Aronica SM. **Altered Bax expression and decreased apoptosis in bone marrow cells of lupus-susceptible NZB/W mice.** *Lupus.* (2001) **10** (11), 785-93.
- *Negri C, Scovassi AI, Cerino A, Negroni M, Borzi RM, Meliconi RF, Montecucco CM, Astaldi-Ricotti GC. **Autoantibodies to poly(ADP-ribose) polymerase in autoimmunity disease.** *Autoimmunity* (1990) **6** (3), 203-9.
- Nicholas RH., Goodwin G.H., (Johns E. ed.) **The HMG chromosomal proteins.** *Acad. Press* (1982). 41-67.
- *Okolie EE., Shall S. **The significance of antibodies to poly(adenosine diphosphate-ribose) in systemic lupus erythematosus.** *Clin. Exp. Immunol.* (1979), **36** 151-164.
- Ozdemir FN., Elsurur R., Okcay A., Ozdemir BH., Sezer S., Kuscu E., Haberal M. **Seronegative systemic lupus erythematosus: etiology of nephrotic syndrome and acute renal failure in early postpartum period.** *Lupus* (2005), **14** (8) 629-63.
- Pisetsky DS. **Systemic lupus erythematosus. A. Epidemiology, pathology and pathogenesis.** In Klippel JH, ed. *Primer on the Rheumatic diseases*, 11th ed. Georgia, USA: Arthritis Foundation, (1997) 246-51.
- Rouleau M., Aubin RA., and Poirier GG. **Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted.** *J. Cell Sci.* (2004) **117**, 815-825.
- Schreider V., Dantzer F., Amè JC., de Murcia G. **Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule.** *Mol. Cell Biol.* (2006) **7**, 517-528.
- *Scovassi AI, Poirier GG. **Poly(ADP-ribosylation) and Apoptosis.** *Mol. Cell. Biochem.* (1999) **199**, 125-137.
- Smeenk R., Hylkema M. **Detection of antibodies to DNA: a technical assessment.** *Mol. Biol. Rep.* (1992) **17**, 71-9.
- Stanton A. Glantz. **Statistica per le discipline biomediche.** IV edizione. McGraw-Hill Libri Italia srl: Milano; p. 130-131.
- Sullivan KE. **Genetics of systemic lupus erythematosus. Clinical implications.** *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* (2000) **26**, 229-56.

- *Tan EM., Cohen S., Fries JF., Masi AT., McShane DJ., Rothfield NF., Schaller JG., Talal N., Winchester RJ. **The 1982 revised criteria for the classification of systemic Lupus Erythematosus Arthritis and Rheumatism.** (1982) **25**, (11) 1271-127.
- Tan EM. **Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune disease and probes for cell biology.** *Adv. Immunol.* (1989) **44**, 93- 151.
- *Tsao BP., Cantor RM., Grossman JM., Shen N., Teophilov NT., Fallace DJ., Arnett FC., Hartung K., Goldstein R., Kalunian KC., Hahn BH., Rotter JI. **PARP alleles within the linked chromosomal region are associated with systemic lupus erythematosus.** *J. Clin. Inv.* (1999) **103**, (11), 35-40.
- *Yee CS., Hussein H., Skan J., Bowman S., Situnayake D. and Gordon C. **Association of damage with autoantibody profile, age, race, sex and disease duration in systemic lupus erythematosus.** *Reumatol.* (2003) **42**, 276-279.

* I lavori indicati con asterisco sono quelli effettivamente consultati.

Ringraziamenti

Un risultato scientifico è il frutto del lavoro concertato di tante persone accomunate dall' amore per la ricerca.

Per la realizzazione di questo lavoro è doveroso ringraziare la Prof.ssa Benedetta Farina e la Prof.ssa Maria Rosaria Faraone Mennella che hanno seguito e curato tutte le fasi di programmazione ed interpretazione delle analisi.

Un ringraziamento è rivolto al Prof. Raffaele Scarpa che ha fornito i campioni di siero utilizzati per la ricerca, e in qualità di Medico e Specialista, ha dato il supporto clinico fondamentale per la comprensione dei risultati.

Al Dott. Francesco Manguso va il ringraziamento, per aver curato la scelta e l' interpretazione delle analisi statistiche, indispensabili per lo studio della significatività dei risultati immunochimici.

Infine, un ringraziamento è diretto a tutti i giovani tesisti e dottorandi, che hanno partecipato in questi anni alle diverse fasi di svolgimento del lavoro e che con il loro entusiasmo hanno fornito un importante contributo.

