

**Finanziamento di due progetti di ricerca scientifica sul LES con 30.000 euro a ciascuno**  
**SCADENZA BANDO 28 NOVEMBRE 2009**  
**Progetto vincitore 1**  
**Coordinatrice: Sandra D'Alfonso**

**Titolo:** "Ricerca di geni coinvolti nella suscettibilità al Lupus Eritematoso Sistemico e valutazione delle loro possibili implicazioni cliniche attraverso un algoritmo per la stima del rischio genetico"

Sandra D'Alfonso, Nadia Barizzone  
Dipartimento di Scienze Mediche Università del Piemonte Orientale A. Avogadro, Novara

Corrispondenza:  
Sandra D'Alfonso  
via Solaroli 17, 28100 Novara  
Telefono numero: 0321 660684  
Fax numero: 0321 620421  
E-mail: dalfonso@med.unipmn.it

**Elenco delle Unità di Ricerca** (Istituzione, Dipartimento, Coordinatore Scientifico):

- 1) Centro di Riferimento per le Malattie Autoimmuni Sistemiche, Università di Milano & Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milano, Dipartimento Medicina Interna; Coordinatore Scientifico: Prof.ssa **R. Scorza**
- 2) Sezione di Clinica Medica, Università Politecnica delle Marche & Ospedali Riuniti, Ancona; Coordinatore Scientifico: Prof.ssa **M.G. Danieli**
- 3) Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini, Roma, Unità Operativa Complessa di Reumatologia; Coordinatore Scientifico: Prof. **G.D. Sebastiani**
- 4) Struttura Semplice di Diagnosi e Cura delle Malattie Autoimmuni Sistemiche Università di Siena, Divisione di Reumatologia; Coordinatore Scientifico: **M. Galeazzi**
- 5) Università Vita-Salute San Raffaele, Milano, Coordinatore Scientifico: Prof. **M.G. Sabbadini**
- 6) Università di Napoli, Unità Operativa di Reumatologia, Coordinatore Scientifico: Prof. **G La Montagna**

A oggi i diversi studi di associazione genetica, basati sull'approccio del gene candidato o di tipo GWA (Genome Wide Association), hanno identificato almeno 30 geni la cui associazione con il LES è stata confermata in due o più studi indipendenti ed è pertanto ritenuta attendibile. Il nostro gruppo di ricerca ha contribuito all'identificazione di molti di questi geni sia nell'ambito di progetti italiani che grazie alla collaborazione con i principali gruppi di ricerca internazionali che si occupano della genetica del LES.

L'identificazione di questi geni è sicuramente assai importante per comprendere i meccanismi patogenetici alla base dello sviluppo della malattia. Tuttavia queste osservazioni fino a questo momento hanno avuto uno scarso impatto nella pratica clinica. La presenza di ciascuno dei singoli alleli di suscettibilità identificati conferisce solamente un modesto rischio rispetto alla sua assenza per cui preso singolarmente nessuno dei loci di suscettibilità al LES ad oggi identificato può avere un valore predittivo-diagnostico.

Tuttavia è possibile che la valutazione dell'effetto combinato dei diversi geni, mediante l'analisi simultanea delle diverse varianti associate, possa aumentarne notevolmente il potere predittivo. Quest'approccio è stato applicato con successo in altre patologie complesse quali malattie metaboliche cardiovascolari e sclerosi multipla. I risultati finora sono promettenti: considerare simultaneamente i diversi fattori genetici aumenta significativamente il potere predittivo della malattia sia

rispetto all'utilizzo dei singoli geni sia rispetto all'analisi dei soli fattori di rischio non genetici (Yang 2003, Yang 2005, Kathiresan 2008, Lyssenko 2008, De Jager 2009).

Allo scopo di definire un algoritmo che permetta di calcolare l'indice di rischio (weighted genetic risk score - wGRS) per il LES abbiamo selezionato in base ai dati presenti in letteratura 52 marcatori di tipo SNP (polimorfismi di un singolo nucleotide) situati in 30 geni. Per ogni gene abbiamo selezionato i marcatori più fortemente associati con la suscettibilità al LES.

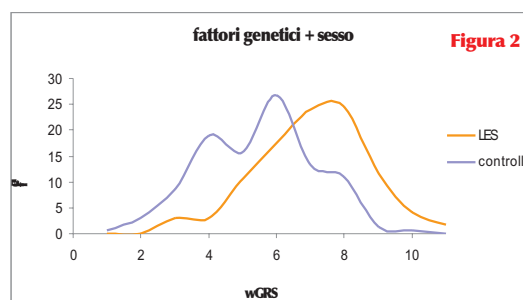
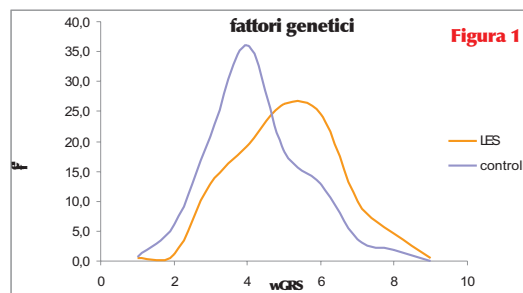
In questa prima analisi molto preliminare, abbiamo incluso nell'algoritmo l'analisi 15 marcatori e abbiamo eseguito l'analisi su 171 pazienti e 164 controlli. Alcuni risultati esemplificativi sono mostrati nella Figura 1 e Figura 2 che riportano le curve in cui il valore di wGRS è messo in relazione con la sua frequenza rispettivamente nei pazienti e nei controlli.

Nonostante i dati siano preliminari, dalla Figura 1 si può comunque osservare come le due curve, non siano sovrapponibili e presentino uno sfasamento che indica che i fattori genetici esaminati sono in grado di distinguere la popolazione dei pazienti da quella dei controlli anche se è evidente ancora una certa sovrapposizione. Lo sfasamento delle due curve è ancora più evidente nella Figura 2, dove nell'algoritmo è stata introdotta anche una variabile clinico-demografica (il sesso). Lo sfasamento tra le due curve può permettere di distinguere tra individui a rischio e non a rischio di sviluppare la malattia. L'analisi statistica ha dimostrato che effettivamente questo primo pannello presenta un potere predittivo statisticamente significativo ( $p < 0.0001$ ), soprattutto quando oltre ai fattori genetici vengono considerate variabili cliniche e demografiche come il sesso o la presenza del fenomeno di Raynaud.

Quest'analisi permette di predire il rischio di malattia e quindi di identificare soggetti ad alto rischio di sviluppare il LES. In particolare essi potranno essere individui con alcuni segni clinici di malattia che non soddisfano ancora i criteri diagnostici oppure i parenti di primo grado dei pazienti, che hanno una probabilità circa 30 volte superiore rispetto alla popolazione generale. Gli individui ad alto rischio di sviluppare la malattia potranno quindi: a) essere seguiti clinicamente in maniera accurata; b) sottoposti a trattamenti ai primi sintomi; c) sottoposti a misure preventive es. eliminazione di fattori di rischio non genetici quali esposizione a fattori ambientali.

In futuro intendiamo allargare la casistica di pazienti e controlli ed includere nell'algoritmo altre varianti genetiche, comprese quelle che man mano emergeranno da futuri GWAS. Con il crescente uso dei metodi d'indagine Genome-Wide, infatti, le nostre conoscenze

sulla genetica del LES sono in continua e rapida espansione. Di conseguenza riteniamo sia scorretto considerare un algoritmo predittivo come un'unità statica; al contrario la lista di loci e di marcatori inclusi in esso dovrebbe essere periodicamente aggiornata, sulle basi sia dei nuovi dati in letteratura che dei risultati da noi stessi ottenuti. Il potere predittivo dell'algoritmo aumenterà con l'aumentare del numero di fattori di rischio genetici che verranno identificati. Inoltre intendiamo includere nell'analisi anche fattori ambientali, clinici, demografici, familiari noti al momento o di futura identificazione, pertanto il potere predittivo potrà essere ulteriormente migliorato nel tempo.



**Finanziamento di due progetti di ricerca scientifica sul LES con 30.000 euro a ciascuno**  
**SCADENZA BANDO 28 NOVEMBRE 2009**  
**Progetto vincitore 2**  
**Coordinatore: Pier Luigi Meroni**

**Titolo:** Validazione di nuovi parametri biologici indicativi dell'interessamento del sistema nervoso centrale in pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico.

#### **PREMESSA**

L'interessamento del sistema nervoso centrale in corso di lupus rappresenta un'evenienza relativamente frequente e di notevole impatto sulla prognosi della malattia e sulla qualità di vita dei pazienti e dei loro famigliari.

Sovente le manifestazioni cliniche del danno al sistema nervoso centrale sono subdole e di difficile diagnosi. Anche le tecniche più moderne (risonanza magnetica, PET, SPECT) non danno quadri diagnostici specifici. Altre indagini strumentali o test funzionali (ad esempio quelli neuropsicologici) non sono sensibili/specifiche o non sono facilmente praticabili. Ciò nonostante vi è frequentemente la necessità urgente di suffragare un sospetto clinico.

Diversi sono i meccanismi responsabili di queste manifestazioni. Si ritiene che molto frequentemente un ruolo importante sia giocato da particolari autoanticorpi in grado di determinare un danno nel tessuto nervoso.

Il progetto finanziato dal Gruppo Italiano LES ha come obiettivo la messa a punto di un test immunoenzimatico (ELISA) per l'identificazione di autoanticorpi in grado di reagire con il recettore NR2 espresso in cellule del tessuto nervoso centrale. Questo tipo di autoanticorpi è stato descritto recentemente come un potenziale meccanismo responsabile di alterazioni neurologiche funzionali in corso di LES. Tuttavia i dati riportati in letteratura sono contrastanti e non vi è una standardizzazione del metodo, tale da consentirne un uso nella pratica comune.

#### **LAVORO SVOLTO NEL PRIMO ANNO**

Sono state messe a punto e paragonate due metodiche ELISA per la determinazione di anticorpi anti-NR2.

La prima utilizza piastre con un peptide (decapeptide) analogo a quello descritto nei lavori originali. Il peptide è stato sintetizzato dal nostro gruppo e la metodica è stata validata in uno studio collaborativo con quella pubblicata dal Dr Omdal (University of Bergen, Norway). La seconda metodica utilizza un peptide ramificato sintetizzato presso l'University of Oklahoma. In collaborazione con il gruppo Americano il test è stato messo a punto in uno studio collaborativo.

Le due metodiche sono state confrontate testando un pannello di sieri da pazienti con LES (n. 20), con sindrome da anticorpi antifosfolipidi primitiva (n.33). Il cut off è stato calcolato utilizzando una serie di campioni di siero da donatori sani di età e sesso sovrapponibile a quello dei pazienti (n. 96). Come ulteriore controllo sono stati testati sieri di pazienti con ipergammaglobulinemia policlonale, sieri con componenti monoclonali e sieri da pazienti con malattie infettive (n. 36) al fine di valutare la specificità del sistema.

La percentuale di sieri di LES positivi per anti/NR2 si è confermata intorno al 30 % con entrambe le metodiche. In generale il test che utilizza piastre copulate con il peptide ramificato presenta una sensibilità sovrapponibile a quello con il decapeptide ma una specificità nettamente migliore. La frequenza infatti di risultati "falsamente" positivi nei campioni di controllo si riduceva drasticamente nelle piastre copulate con il peptide ramificato.

Il numero relativamente piccolo di pazienti con LES studiati fino ad ora non ha permesso di trovare associazioni statisticamente significative tra la presenza di anti/NR2 e manifestazio-

ni nervose centrali. Tuttavia la prima parte dello studio aveva come target principale la validazione della metodica. Viceversa, la seconda parte della ricerca prevederà l'applicazione della metodica validata allo studio di un ampio gruppo di pazienti di LES sfruttando la collaborazione tra le unità operativi partecipanti al progetto.

Sempre nell'ottica di validare i test per l'individuazione degli anticorpi anti-NR2, abbiamo inoltrare paragonato i test ELISA con due differenti metodiche che sono state recentemente utilizzate per la ricerca di questi autoanticorpi: a) immunofluorescenza indiretta su cellule HEK transfettate con NR1 & NR2 e b) immunofluorescenza indiretta su sezioni criostatiche di tessuto nervoso cerebrale di ratto. Queste due metodiche sono state eseguite in collaborazione con il Dipartimento di Neuroscienze U.O. di Neurologia, Ospedale Ca' Foncello Azienda ULSS n.9 – TREVISO (Prof. B. Giometto).

I due test in immunofluorescenza si sono rivelati poco sensibili e nessuno dei campioni positivi per anti-NR2 in ELISA si è riconfermato né sui vetrini di cellule HEK transfettate né nelle sezioni criostatiche.

Utilizzando i due test ELISA, collateralmente abbiamo documentato per la prima volta nel gruppo di campioni di siero da pazienti con sindrome da anticorpi antifosfolipidi primitiva una incidenza di anti-NR2 sovrapponibile a quella documentabile in corso di LES.

### **CONCLUSIONI**

- Abbiamo raggiunto una standardizzazione del sistema ELISA con il peptide ramificato per l'individuazione di autoanticorpi anti-NR2.
- Il sistema è operativo per il suo utilizzo nella seconda fase del progetto volto ad una validazione dell'associazione tra la presenza di questi autoanticorpi ed interessamento del sistema nervoso centrale in corso di LES.
- L'uso delle tecniche in immunofluorescenza indiretta su cellule HEK transfettate su sezioni criostatiche di tessuto cerebrale di ratto non sembrano dare un significativo contributo all'identificazione di questi autoanticorpi.
- Titoli elevati di autoanticorpi anti-NR2 possono essere trovati in sieri di LES. Non possiamo confermare al momento l'associazione tra gli autoanticorpi e le manifestazioni cliniche stante la casistica relativamente limitata che è stata indagata.
- Per la prima volta vengono riportati elevati livelli di anticorpi anti-NR2 nei sieri di pazienti con forme primitive di sindrome da anticorpi antifosfolipidi.

### **PROGRAMMA PER IL SECONDO ANNO**

- Valutazione dell'associazione o meno degli anti-NR2 con interessamento del sistema nervoso centrale in corso di LES utilizzando un'ampia casistica policentrica.
- Validazione del dato preliminare in corso di sindrome da anticorpi antifosfolipidi primitiva.
- Studio della possibilità di utilizzare forme ciclicizzate dei peptidi al fine di incrementare la sensibilità del sistema per l'individuazione degli autoanticorpi (in collaborazione con il Dipartimento R&D della Ditta INOVA – San Diego, Ca - USA).